

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Funktionelle Aspekte  
immunstimulatorischer Ribonukleinsäuren**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Berger

aus Essen

2009



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gunther Hartmann

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Max Schnurr

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. Maria-Christina Jung

Priv. Doz. Dr. med. Marion Subklewe

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Veit Hornung

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2009



Meinen Eltern in Dankbarkeit



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das Immunsystem des Menschen</b>	<b>1</b>
1.1.1. Prinzipien der Immunreaktion	1
1.1.2. Das angeborene Immunsystem	2
1.1.3. Das adaptive Immunsystem	3
1.1.4. Unterschiedliche Erkennungsmechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität	5
1.1.5. <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptoren	6
1.1.6. Pathogenerkennung durch <i>Pattern-recognition</i> -Rezeptoren	7
<b>1.2. Effektormechanismen der angeborenen Immunität</b>	<b>16</b>
1.2.1. Zytokine	16
1.2.2. Natürliche Killerzellen	21
<b>1.3. Effektormechanismen der adaptiven Immunität</b>	<b>26</b>
1.3.1. T-Lymphozyten	26
<b>1.4. Dendritische Zellen und die Regulation von angeborener und adaptiver Immunität</b>	<b>28</b>
1.4.1. Plasmazytoide dendritische Zellen	29
1.4.2. Myeloide dendritische Zellen	30
1.4.3. Monozyten	31
1.4.4. <i>Crosstalk</i> zwischen dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion	33
<b>1.5. Nukleotidsequenzen als Adjuvans in der Immuntherapie</b>	<b>36</b>
1.5.1. Die Erkennung von Ribonukleotiden als Abwehrmechanismus	36
1.5.2. Wirkung auf das Immunsystem	37
1.5.3. Die Verwendung von Oligoribonukleotiden als Therapeutika	41
1.5.4. Immunstimulatorische RNA als Therapeutika der Zukunft	42
1.5.5. Alternative Immunstimulation von Natürlichen Killerzellen und anderen Effektorzellen	43
<b>1.6. Fragestellung</b>	<b>45</b>





---

<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>47</b>
<b>2.1. Reagenzien, Chemikalien und Geräte</b>	<b>47</b>
2.1.1. Geräte	47
2.1.2. Chemikalien	47
2.1.3. Radioaktive Chemikalien	48
2.1.4. Reagenziensätze	48
2.1.5. Materialien für die Zellkultur	48
2.1.6. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen	49
2.1.7. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen	49
2.1.8. Antikörper	51
2.1.9. Oligodesoxynukleotide	52
2.1.10. Immunstimulatorische Ribonukleotide	52
2.1.11. Primer für die <i>Real-time</i> -PCR	53
2.1.12. Zelllinien	53
<b>2.2. Zellulär-immunologische Methoden</b>	<b>54</b>
2.2.1. Zellkultur	54
2.2.2. Durchflusszytometrie	55
2.2.3. Aufreinigung von Zellpopulationen	58
2.2.4. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	60
2.2.5. Zellvermittelter Zytotoxizitätstest ( <sup>51</sup> Chrom-Lyse-Test)	60
<b>2.3. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>62</b>
2.3.1. Extraktion zytoplasmatischer RNA	62
2.3.2. Gelelektrophorese	62
2.3.3. Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukleotiden	63
2.3.4. Reverse Transkription	63
2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion	63
<b>2.4. Statistische Analyse</b>	<b>67</b>



<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>69</b>
<b>3.1. Zytokin-Induktion einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunantwort</b>	<b>69</b>
3.1.1. Die Stimulation mit immunstimulatorischer RNA induziert eine T <sub>H</sub> 1-gerichtete Immunantwort in peripheren mononukleären Zellen des Blutes	69
3.1.2. Natürliche Killerzellen und T-Zellen sind die Produzenten von IFN- $\gamma$	71
<b>3.2. Eigenschaften der Immunstimulation</b>	<b>75</b>
3.2.1. Die Aktivierung der Effektorzellen zur Produktion von IFN- $\gamma$ erfolgt nicht direkt, sondern ist abhängig von akzessorischen Zellen	75
3.2.2. Die Vorstimulation mit immunstimulatorischer RNA hat keinen Einfluss auf die <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Expression	79
3.2.3. Die indirekte Aktivierung der Natürlichen Killerzellen ist im murinen System abhängig von <i>Toll-like</i> -Rezeptor 7	81
3.2.4. Das Verhältnis akzessorischer Zellen zu Natürlichen Killerzellen sowie die Art des <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Liganden entscheidet über das Ausmaß der Aktivierung	83
3.2.5. Plasmazytoide dendritische Zellen führen zu einer Aufregulierung des Oberflächenmarkers CD69, nicht aber zur Produktion von IFN- $\gamma$	88
3.2.6. Die Stimulation mit immunstimulatorischer RNA führt zur Induktion regulatorischer Zytokine	91
3.2.7. Die Aktivierung der Effektorzellen und akzessorischen Zellen ist reziprok	94
<b>3.3. Mechanismen der Effektorzellaktivierung</b>	<b>96</b>
3.3.1. Nur lösliche Faktoren im Überstand der akzessorischen Zellen sind für die Aktivierung der Effektorzellen verantwortlich	96
3.3.2. IL-12p70 ist notwendig für die RNA-abhängige Aktivierung von Natürlichen Killerzellen	100
<b>3.4. Induktion von Zytotoxizität</b>	<b>102</b>
3.4.1. Die Stimulation mit immunstimulatorischer RNA steigert die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen gegenüber Tumorzellen	102



---

<b>4. DISKUSSION</b>	<b>105</b>
<b>4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde</b>	<b>105</b>
<b>4.2. Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur</b>	<b>107</b>
4.2.1. Die Erkennung von RNA durch das Immunsystem	107
4.2.2. Gezielte Immunstimulation durch RNA über <i>Toll-like</i> -Rezeptor 7 und 8	108
4.2.3. Das Zytokin-Induktionsmuster nach Stimulation mit immunstimulatorischer RNA	111
4.2.4. Abhängigkeit von akzessorischen Zellen bei der Aktivierung der Immunabwehrzellen	115
4.2.5. Reziproke Aktivierung akzessorischer Zellen durch Immuneffektorzellen	117
4.2.6. Lösliche Faktoren und Zell-Zellkontakt bei der Aktivierung von Natürlichen Killerzellen	119
4.2.7. Steigerung der zytotoxischen Aktivität durch immunstimulatorische RNA	121
4.2.8. <i>Toll-like</i> -Rezeptor-Expressionsmuster von Natürlichen Killerzellen	124
<b>4.3. Klinische Bedeutung der Ergebnisse</b>	<b>126</b>
4.3.1. Interaktion von Monozyten und Natürlichen Killerzellen bei der Erkennung von Pathogenen in entzündeten Geweben	126
4.3.2. Monozyten sind für die Erkennung von Viren wichtig	126
4.3.3. RNA als spezifisches immunstimulatorisches Adjuvans	127
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>129</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>132</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme</b>	<b>143</b>
<b>Danksagung</b>	<b>147</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>148</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>150</b>



# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem des Menschen

Wie alle lebenden Organismen ist der Mensch Zeit seines Lebens durch seine Umwelt bedroht. Die Auseinandersetzung mit in den Organismus eindringenden Mikroorganismen sowie die Entwicklung von körpereigenen, pathologisch transformierten Zellen stellt für ihn eine fortwährende Bewährungsprobe dar. Um sich gegen diese Bedrohungen schützen zu können, haben die höheren Lebensformen im Laufe der Evolution verschiedene Abwehrmechanismen entwickelt, die unter dem Begriff des Immunsystems zusammengefasst werden. Das humane Immunsystem ist ein ausgesprochen vielschichtiges Konstrukt. Es ist über Millionen von Jahren durch den Selektionsdruck der Evolution gereift und setzt sich aus einer großen Zahl von Zellen und Molekülen zusammen.

Das Zusammenspiel der zahlreichen Bestandteile als Ganzes ist für die Integrität eines jeden Organismus unabdingbar. Bleibt zum Beispiel eine Immunreaktion im Falle einer Infektion aus oder ist zu schwach, nimmt der angegriffene Organismus Schaden. Kommt es umgekehrt zu einer überschießenden Immunreaktion, die über das Ausmaß der Gefahr hinausgeht, werden die Zellen des Organismus durch das eigene Abwehrsystem in Mitleidenschaft gezogen. Zentraler Bestandteil des Immunsystems ist es demnach, körperfremde oder körpereigene aber entartete Zellen, die eine Bedrohung für den Organismus darstellen, zu eliminieren. Während dieses Prozesses müssen gleichzeitig die gesunden Strukturen des Organismus unberührt bleiben. Dieses essentielle Prinzip wird als die Unterscheidung zwischen *Selbst* und *Fremd* bezeichnet.

Es bestehen verschiedene Klassifikationssysteme, nach denen das Immunsystem unterteilt werden kann. Evolutionsgeschichtlich wird das Immunsystem traditionell in die angeborene und die adaptive Immunität unterteilt.

### 1.1.1. Prinzipien der Immunreaktion

Das Werkzeug des Immunsystems ist die Immunreaktion. Der koordinierte und ungestörte Ablauf der Immunreaktion ist letztlich ausschlaggebend für die Integrität des Organismus. Sie beinhaltet vier unabdingbare Komponenten.

Als erstes muss das Eindringen von Mikroorganismen in den Körper bzw. die Entartung körpereigener Zellen durch das Immunsystem als Gefahr erkannt werden. Dies wird durch die Zellen der angeborenen Immunität gewährleistet. Dieselben Zellen, welche für die Erkennung verantwortlich sind, melden die Gefahr an nachgeschaltete Zellen des Immunsystems. So wird der nächste Schritt der Immunreaktion, die eigentliche Bekämpfung der Gefahr, eingeleitet. Ziel dieser Abwehr ist es, die Gefahr lokal zu begrenzen oder im idealen Fall sogar gänzlich zu eliminieren. Wichtige Komponenten bei der Abwehr sind vor allem zellulärer Natur wie die zytotoxischen T-Zellen (CTLs) und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), aber auch lösliche Produkte wie die durch B-Zellen gebildete Antikörper und das Komplementsystem. Der dritte unabdingbare Schritt der Immunreaktion ist es, die Abwehr in einem der Gefahr entsprechend sinnvollen Maß zu begrenzen. Wichtig ist hierbei, von Beginn an die Immunreaktion nur auf die geschädigten Zellen zu fokussieren und körpereigene Zellen nicht in Mitleidenschaft zu ziehen. Als letzten Schritt einer sinnvollen Immunreaktion steht die Generierung eines immunologischen Gedächtnisses. Dieses bedingt, dass durch einen erneuten Kontakt mit derselben oder einer ähnlichen Gefahrenstruktur eine schnellere und stärkere Immunreaktion ausgelöst wird. Diese letztgenannte Eigenschaft macht man sich bei der Impfung zu Eigen. Indem man dem Immunsystem durch abgeschwächte Erreger eine Infektion vortäuscht, besteht bei Kontakt mit dem tatsächlichen Erreger gegenüber dieser Immunität.

### 1.1.2. Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Immunität ist der adaptiven Immunität vorgeschaltet, sie bewerkstelligt den Erstkontakt mit einem in den Körper eindringenden Mikroorganismus. Dem angeborenen Immunsystem gehören verschiedene Zellen an. Zu seinen Komponenten zählen neben der mechanischen Barriere von Oberflächenepithelien wie verhornter Körperhaut und Schleimhäute auch die Zilien des Respirationstraktes oder der saure pH des Magens. Darüber hinaus besitzen einige Zellen des angeborenen Immunsystems ein Repertoire definierter Rezeptoren, die *Pattern-recognition-Rezeptoren* (PRRs). Diese haben sich unter dem Selektionsdruck der Evolution gebildet. Die PRRs des angeborenen Immunsystems sind dazu befähigt, überlebenswichtige, stark konservierte molekulare Strukturen der verschiedensten Mikroorganismen zu erkennen. Nach der Erkennung kommt es zur initialen Abwehrreaktion durch Phagozytose. Zum anderen wird durch die Ausschüttung regulatorischer Zytokine und durch Antigenpräsentation die Immunreaktion des



adaptiven Immunsystems eingeleitet. Die Erkennung über PRRs wird ausführlich unter 1.1.4. bis 1.1.6. besprochen.

### 1.1.3. Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunität ist dazu befähigt, fremde Mikroorganismen und Moleküle über antigene Strukturen zu erkennen und selektiv zu eliminieren. Entgegen der angeborenen Immunität ist die Immunantwort der adaptiven Immunität innerhalb einer Spezies unterschiedlich und repräsentiert die Auseinandersetzung des Immunsystems mit spezifischen Antigenen. Das adaptive Immunsystem beinhaltet vier charakteristische Attribute. Die *Antigen-Spezifität* erlaubt es, selbst zwischen geringsten Unterschieden von nur einer Aminosäure in der Strukturen von Proteinen zu unterscheiden. Darüber hinaus beinhaltet das Prinzip der *Diversität*, dass eine gewaltige Zahl antigener Strukturen erkannt werden können. Nach der Auseinandersetzung mit einem Antigen kommt es zu der Induktion des *immunologischen Gedächtnisses*. Das vierte Charakteristikum der adaptiven Immunität ist die bereits angesprochene Unterscheidung zwischen *Selbst* und *Fremd*.

Die B- und T-Lymphozyten sind die Hauptkomponenten der adaptiven Immunität. Die B-Zellen vermögen es, nach Stimulation durch einen entsprechenden Reiz zu Plasmazellen auszureifen, die dann spezifische Immunglobuline produzieren. B-Zellen erkennen Antigene über den B-Zell-Rezeptor(BZR)-Komplex. Für die Aktivierung der B-Zelle zur Ausreifung bedarf es je nach Art des gebundenen Antigens darüber hinaus den direkten Kontakt zu T<sub>4</sub>-Helferzellen. Die durch T<sub>4</sub>-Helferzellen produzierten löslichen Faktoren alleine reichen nicht aus. T<sub>4</sub>-Helferzellen sind eine von mehreren Populationen der T-Lymphozyten. Die wichtigsten Populationen neben dieser sind die CD8<sup>+</sup> CTLs, die regulatorischen T-Zellen und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Die CD8<sup>+</sup> CTLs sind von besonderer Bedeutung. Entscheidend ist, dass die Erkennung nur nach vorangegangener Antigenprozessierung und -präsentation über *Major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle möglich ist. CTLs können angegriffene Zellen direkt lysieren und tragen damit eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von Viren und Krebszellen.

Durch den Prozess der somatischen Rekombination ist jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Antigenrezeptor ausgestattet. Die Mannigfaltigkeit des Rezeptor-Repertoires führt zu einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit, dass zu jedem Antigen ein Lymphozyt existiert, der für ein Antigen spezifisch ist. Die Erkennung eines

spezifischen Antigens aktiviert diesen Lymphozyten und führt so zu seiner Vermehrung und zur Wahrnehmung seiner entsprechenden Effektorfunktion. Der Prozess der Vermehrung und Differenzierung eines Lymphozyten nach seiner spezifischen Antigenerkennung wird als klonale Selektion bezeichnet. Die klonale Selektion stellt das Herzstück der adaptiven Immunabwehr dar. Sie garantiert, dass zum Beispiel zum Zeitpunkt einer viralen Infektion solche Zellen in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen, die für eine effektive Immunantwort benötigt werden. Die beschriebene Bereitstellung von antigenspezifischen Lymphozyten ist jedoch ab dem Zeitpunkt einer Infektion um circa drei bis fünf Tage verzögert.

Die BZR und T-Zell-Rezeptoren (TZR) der adaptiven Immunität werden somatisch während der Lymphozytenreifung durch Rekombination der Rezeptor-kodierenden Gene angelegt. Jeder Lymphozyt ist folglich mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausgestattet. Da diese Rezeptoren nicht in der Keimbahn kodiert werden, sind sie nicht für ein spezifisches Antigen prädestiniert. Aus dem somit zufällig generierten Rezeptor-Repertoire werden im Laufe des Lebens solche Zellen durch positive Selektionsmechanismen ausgewählt, die ihr spezifisches Antigen erkennen und somit für das sich entwickelnde Immunsystem förderlich sind. Die dazugehörigen Lymphozyten werden klonal expandiert. Entsteht bei der zufälligen Verteilung der Rezeptor-Spezifitäten auf einen Lymphozyt ein Rezeptor, der für Strukturen auf den Zellen des eigenen Organismus spezifisch ist und so eine Immunreaktion gegenüber dem eigenen Körper auslösen würde, wird dieser Lymphozyt während der Reifung eliminiert (negativer Selektionsmechanismus). Die TZR und BZR der Lymphozyten des adaptiven Immunsystems stellen theoretisch für jeden Organismus einen Selektionsvorteil dar. Jedoch müssen sie von jeder Generation „neu geschaffen“ werden, da sie nicht in der Keimbahn kodiert sind und somit nicht vererbt werden können.

Das adaptive Immunsystem galt lange gegenüber dem angeborenen Immunsystem als höher entwickelt. Die Forschung der vergangenen Jahre hat eindrucksvoll zeigen können, dass auch das angeborene Immunsystem über eine beeindruckende Komplexität verfügt und viel höher entwickelt ist, als zunächst angenommen. Die beiden Komponenten sind somit als Bestandteile einer gemeinsamen Immunabwehr zu verstehen. Die angeborene Immunität hat Sensor- und Aktivatorfunktion für die darauf folgende spezifische Immunantwort. Umgekehrt führt die Aktivierung des adaptiven Immunsystems zur Sezernierung von löslichen Molekülen, welche die Phagozytose der

angeborenen Immunität steigert und somit diese verstärkt. Die Erforschung der angeborenen Immunität ist ein zentraler Ansatzpunkt in der Immunologie von heute.

#### 1.1.4. Unterschiedliche Erkennungsmechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität

Die zwei Komponenten des Immunsystems besitzen unterschiedliche Mechanismen, um zwischen *Selbst* und *Fremd* zu unterscheiden. Die T- und B-Zellen des adaptiven Immunsystems tragen entsprechend entweder den TZR oder den BZR. T- und B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche viele TZR und BZR, jedoch ist jeder Rezeptor jeweils nur für ein Antigen spezifisch und eine Zelle trägt jeweils nur Rezeptoren einer Spezifität. Dies ist bei der angeborenen Immunität grundlegend verschieden. Zellen der angeborenen Immunität, zum Beispiel die dendritischen Zellen (DCs), tragen verschiedenste Rezeptoren spezifisch für die unterschiedlichsten mikrobakteriellen Strukturen. Auch werden vom angeborenen Immunsystem keine antigene Strukturen erkannt. Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene anhand von konservierten Strukturen, so genannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Es verwendet hierzu einen definierten Satz von Rezeptoren, die bereits angesprochenen PRRs.

Die TZR und BZR erkennen vor allem proteinerge Antigene, die durch den Prozess der Antigenpräsentation aufbereitet sind. PRRs dagegen erkennen breiter gefasste, molekulare Motive vitaler Organismen. Die von den PRRs erkannten Motive beinhalten Zucker- und Proteinstrukturen, einige spezifische lipidhaltige Moleküle sowie einige Nukleinsäure-Kombinationen.

Darüber hinaus bestehen weitere Unterschiede bei der Erkennung. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem werden die Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität durch Keimbahn-kodierte Rezeptoren vermittelt. Die Spezifität eines jeden Rezeptors ist daher genetisch determiniert. Die angeborene Immunität hat sich im Laufe der Evolution lange vor der adaptiven Immunität entwickelt. Jedes mehrzellige Lebewesen verfügt über irgendeine, meist primitivere Form der angeborenen Immunität. Die Kodierung der Gene dieser Rezeptoren auf der Keimbahn hat zum Vorteil, dass diese Rezeptoren unmittelbar für die Fremderkennung zur Verfügung stehen, wobei das adaptive Immunsystem eine Reifungsphase durchlaufen muss. Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems haben sich unter dem Selektionsdruck der Evolution zu Mikroorganismus-spezifischen Rezeptoren herausgebildet. Diese

können von Generation zu Generation weitergegeben werden. Der Nachteil der Keimbahn-Kodierung besteht darin, dass jedes Genom in Größe und Anzahl kodierender Gene limitiert ist und somit nur ein limitierter Satz an Fremderkennungsmechanismen vererbt werden kann. Man vermutet, dass lediglich 0,1 bis 1 Prozent aller kodierenden Gene des menschlichen Genoms mit dem Immunsystem in Verbindung zu bringen sind. Im Vergleich dazu werden im Laufe des Lebens durch den Prozess der somatischen Rekombination  $10^{14}$  bis  $10^{18}$  verschiedene T-Zellrezeptoren und Immunglobuline generiert.

Die dargestellten Ausführungen lassen darauf schließen, dass die Anzahl der zur Verfügung stehenden Rezeptoren in keinerlei Verhältnis zu der großen Zahl an heterogenen Mikroorganismen steht, die durch ihre genetische Instabilität mittels Mutationen unter Selektionsdruck den Erkennungsmechanismen des Immunsystems leicht entkommen würden. Diesem Ungleichgewicht zugrunde liegend haben sich die PRRs herausgebildet.

#### 1.1.5. *Pattern-recognition*-Rezeptoren

PRRs sind ein integraler Bestandteil der Erkennung von Mikroben durch das Immunsystem und gehören dem angeborenen Immunsystem an. Sie erkennen PAMPs, also Struktur motive oder Moleküle, die charakteristisch für ein breites Spektrum an Mikroorganismen sind. Sie stellen zwar strukturell eine sehr heterogene Gruppe dar, teilen jedoch einige gemeinsame Eigenschaften. Zunächst sind PAMPs spezifisch für mikrobielle Pathogene und kommen im Wirtsorganismus nicht vor. Daher ist die Unterscheidung zwischen *Selbst* und *Fremd* in der Regel perfekt. Dies steht in ausgeprägtem Gegensatz zu den Erkennungsrezeptoren der adaptiven Immunität. Trotz des negativen Selektionsprozesses während der Reifung von Lymphozyten kommt es gelegentlich zur Ausbildung spezifischer Rezeptoren gegen körpereigene Strukturen und damit zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Die von den PRRs des angeborenen Immunsystems erkannten Strukturen sind essenziell für den Überlebensvorteil des Pathogens und können daher trotz Selektionsdruck des Wirts über die Zeit nur bedingt mutieren. Letztlich handelt es sich bei den erkannten Strukturen in der Regel um invariante Strukturen, die von einer großen Klasse von pathogenen Keimen geteilt werden. Wie auch die Rezeptoren der adaptiven Immunität sind die PRRs proteinerge Strukturen. Die verschiedenen Kodierungsorte der Gene für die Rezeptoren wurden bereits angesprochen.

Die PRRs werden von verschiedenen Zellen der angeborenen Immunität exprimiert, insbesondere den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen, Monozyten und DCs. Das Expressionsmuster ist, wie oben aufgeführt, jedoch nicht klonal verteilt, sondern alle Zellen einer bestimmten Subpopulation exprimieren Rezeptoren einer identischen Spezifität (Hornung, Rothenfusser et al. 2002). Darüber hinaus ist die auf eine Rezeptorstimulation folgende Antwort der jeweiligen Zelle, im Gegensatz zur verzögerten Proliferationsantwort der adaptiven Immunzelle, durch eine unmittelbare Reaktion gekennzeichnet. Es ist eine Vielzahl von PRRs beschrieben. An der Oberfläche von Zellen lokalisierte Rezeptoren beinhalten die Familie der Lektin-Rezeptoren sowie der Scavenger-Rezeptoren (Peiser, De Winther et al. 2002; Peiser, Mukhopadhyay et al. 2002). Zytosolische Rezeptoren sind die erst kürzlich beschriebenen *nucleotide binding oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLRs) und *retinoic acid-inducible gene I* (RIG-I)-like helicases (RLHs) (Kumagai, Takeuchi et al. 2008). Neben den genannten Rezeptorfamilien erfüllen die TLRs die Kriterien der PRRs (Banchereau, Briere et al. 2000; Barton and Medzhitov 2002). Letztere können sowohl endosomal als auch membranständig lokalisiert sein.

Im Folgenden wird die Erkennung von Pathogenen durch die verschiedenen PRRs ausführlich beschrieben. Ein besonderer Fokus wird auf die Erkennung durch die TLRs gelegt.

#### 1.1.6. Pathogenerkennung durch *Pattern-recognition*-Rezeptoren

Die Erkennung von Pathogenen durch die verschiedenen PRRs ist insgesamt sehr heterogen, beinhaltet aber auch einige Überschneidungen. Es kann eine TLR-abhängige von einer TLR-unabhängigen Erkennung abgegrenzt werden.

##### 1.1.6.1. *Toll-like*-Rezeptor-abhängige Erkennung

Die Familie der TLRs ist eine Gruppe von Rezeptoren, die, dem eben beschriebenen Muster entsprechend, stark konservierte repetitive Strukturen von Mikroben erkennt. *Toll*-Rezeptoren sind evolutionär hoch-konservierte Transmembranproteine (Anderson 2000). Ihre Funktion wurde zuerst im Zusammenhang mit der dorsoventralen Ausrichtung in der Embryonalentwicklung der *Drosophila* beschrieben (Hashimoto, Hudson et al. 1988; Belvin and Anderson 1996).

Durch Zufall wurde bald darauf eine bedeutende Rolle dieses Rezeptors in der Abwehr von Pilzinfektionen der *Drosophila* entdeckt (Lemaitre, Nicolas et al. 1996; Nicolas, Nappi et al. 1996). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Protein, das dem *Toll* verwandt ist und den Namen *18-wheeler* trägt, eine bedeutende Funktion in der antibakteriellen Abwehr der Fruchtfliege einnimmt (Williams, Rodriguez et al. 1997). Bei der Durchsicht von humanen Gendatenbanken wurde kurz darauf eine dem *Drosophila-Toll*-Gen verwandte Sequenz im menschlichen Genom identifiziert, welche später humaner TLR1 getauft wurde (Nomura, Takihara et al. 1994; Taguchi, Mitcham et al. 1996). Janeway und Mitarbeiter identifizierten bei ihrer Suche nach Erkennungsstrukturen des angeborenen, humanen Immunsystems mit hTLR4 das erste strukturhomologe Protein des *Drosophila-Toll* im humanen System (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). Janeway hatte bereits Jahre vorher die Existenz solcher Rezeptoren postuliert (Janeway 1992). Den eindeutigen Beweis, der TLR4 als einen PRR des angeborenen Immunsystems schlechthin klassifizierte, brachte die Beobachtung, dass TLR4 dem Lipopolysaccharid (LPS)-Signalkomplex der Maus angehört. Poltorak et al. konnten als erste zeigen, dass Mäuse mit spontaner Mutation des TLR4-Gens nicht auf LPS-Stimulation reagierten und somit eine sonst tödliche Endotoxin-Gabe schadlos überstanden (Poltorak, He et al. 1998; Poltorak, Smirnova et al. 1998). Diese Beobachtung wurde später an TLR4-*Knockout*-Mäusen durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Hoshino, Takeuchi et al. 1999; Qureshi, Lariviere et al. 1999).

Mittlerweile sind 13 murine und 11 humane TLRs bekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass weitere Vertreter dieser Proteinfamilie im Laufe der Annotierung des humanen Genoms identifiziert werden (Ishii, Uematsu et al. 2006). Zu den Liganden der TLRs gehören überwiegend Strukturen, welche mikrobiellen Ursprungs sind. Manche TLRs reagieren auf endogene Bestandteile wie zum Beispiel Fibronektin oder andere fragmentierte Bestandteile der extrazellulären Matrix, Hyaluronan, Chromatin sowie Hitzeschockproteine. Die genannten Strukturen können im Rahmen von Zellschädigungen aus diesen freigesetzt werden.

Innerhalb der TLRs können aufgrund der molekularen Zusammensetzung der Liganden Subfamilien unterschieden werden. TLR1, TLR2 und TLR6 erkennen Lipide und Zuckerstrukturen von Gram-positiven Bakterien. TLR2 ist hauptverantwortlich für die Erkennung von Peptidoglykan, Lipoteichonsäure und Lipoprotein. TLR2 kann mit TLR1 und mit TLR6 Heterodimere bilden und so ein gesondertes molekulares Motiv

erkennen (Takeuchi, Hoshino et al. 1999; Takeuchi, Kawai et al. 1999; Takeuchi, Kaufmann et al. 2000).

Wie bereits erwähnt erkennt TLR4 LPS, einen Bestandteil von Gram-negativen Bakterien. Das Lipid A ist hierbei für die immunstimulatorische Aktivierung verantwortlich. Die Erkennung von LPS beinhaltet zusätzlich die Rekrutierung von MD-2, CD14 und dem lipid-bindenden Protein (LBP) (Poltorak, He et al. 1998; Hoshino, Takeuchi et al. 1999).

Einige der TLRs erkennen Proteine. TLR5 ist der Rezeptor für bakterielles Flagellin (Hayashi, Smith et al. 2001; Uematsu, Jang et al. 2006). TLR11 ist bei der Erkennung von Profilin, einem Protein des Parasiten *Toxoplasma gondii*, involviert (Yarovinsky, Zhang et al. 2005). TLR11 ist ebenfalls bei der Erkennung einiger uropathogener Keime involviert, wobei die genaue Charakterisierung des molekularen *Patterns* noch aussteht (Zhang, Zhang et al. 2004).

TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind für die Erkennung von Nukleinsäuren verantwortlich. Entgegen den bisher genannten TLRs ist diese Subfamilie von TLRs an den zytoplasmatischen Membranen von Endosomen und Lysosomen lokalisiert. TLR3 erkennt doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA). Virale dsRNA entsteht beim Replikationszyklus von einzelsträngigen RNA (ssRNA)-Viren. Dieser Umstand erklärt die Bedeutung von TLR3 bei der viralen Erkennung (Alexopoulou, Holt et al. 2001). Experimentell kann TLR3 durch Polyinosine-Polycytidylsäure (Poly(I:C)), einer synthetischen dsRNA, stimuliert werden. TLR7 und TLR8 erkennen im humanen System kurze ssRNA und kurze dsRNA sowie einige selektive, synthetische Guanosin-Analoga (Hornung, Schlender et al. 2004). Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe haben maßgeblich zu dieser Erkenntnis beigetragen (Hornung, Schlender et al. 2004). TLR9 erkennt hingegen CpG-Motive unmethylierter, doppelsträngiger DNA (CpG-ODN, CpG-DNA), wie sie typischerweise bei Bakterien vorkommt (Hemmi, Takeuchi et al. 2000).

Die Tabelle 1 zeigt einen Überblick zu dem aktuellen Wissen über bekannte TLR-Agonisten. Zusätzlich wird an dieser Stelle auf ausführliche Übersichtsartikel verwiesen (Barton and Medzhitov 2002; Underhill 2003; Ishii, Uematsu et al. 2006).

TLR	PAMP	Herkunft	Referenz
TLR1	kooperiert mit TLR2		
TLR2	Lipoproteine	Gram-positive Bakterien	(Takeuchi, Hoshino et al. 1999)
	Zyomosan	Hefen	(Ozinsky, Smith et al. 2000; Ozinsky, Underhill et al. 2000)
	<i>Macrophage-activating lipopeptide 2</i> (MALP-2)	Mykoplasmen	(Takeuchi, Hoshino et al. 2000; Takeuchi, Kaufmann et al. 2000)
	Lipoarabinomannan (LAM)	Mykobakterien	(Underhill, Ozinsky et al. 1999)
TLR3	dsRNA	Viren	(Alexopoulou, Holt et al. 2001)
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien	(Poltorak, Smirnova et al. 1998; Hoshino, Takeuchi et al. 1999)
	Protein F	RSV	(Kurt-Jones, Popova et al. 2000)
	Hsp 60	Wirt	(Ohashi, Burkart et al. 2000)
	Hyaluronan	Wirt	(Termeer, Benedix et al. 2002)
	Fibronektin	Wirt	(Okamura, Watari et al. 2001)
TLR5	Flagellin	Verschiedene gram-negative Bakterien	(Hayashi, Smith et al. 2001)
TLR6	kooperiert mit TLR2		(Takeuchi, Kawai et al. 1999)
TLR7	ssRNA und dsRNA, Guanosin-Analoga	Viren	(Hemmi, Kaisho et al. 2002; Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005)
TLR8	ssRNA und dsRNA, Guanosin-Analoga	Viren	(Jurk, Heil et al. 2002)
TLR9	CpG-Motive	Bakterien, Viren	(Hemmi, Takeuchi et al. 2000)
TLR10	nicht bekannt	nicht bekannt	
TLR11	Profilin, <i>Profilin-like protein</i>	Toxoplasma gondii	(Yarovinsky, Zhang et al. 2005)

**Tab. 1      Humane TLRs und ihre Liganden**



#### 1.1.6.2. Signaltransduktion der *Toll-like*-Rezeptor-abhängigen Erkennung

Die TLRs tragen in der Ektodomäne Leucin-reiche Sequenzabschnitte, die von charakteristischen Cystein-reichen Motiven umgeben werden. Die intrazytoplasmatische Region enthält eine *Toll*-homologe Domäne, die für die Signaltransduktion des jeweiligen TLR-Proteins entscheidend ist. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu dem Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) wird sie als Toll/ IL-1R-Domäne (TIR) bezeichnet (Rock, Hardiman et al. 1998). Die Signaltransduktion durch TLRs resultiert in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Anhand des Beispiels für TLR7 und TLR9 sollen die Prinzipien der Signaltransduktion der TLRs verdeutlicht werden.

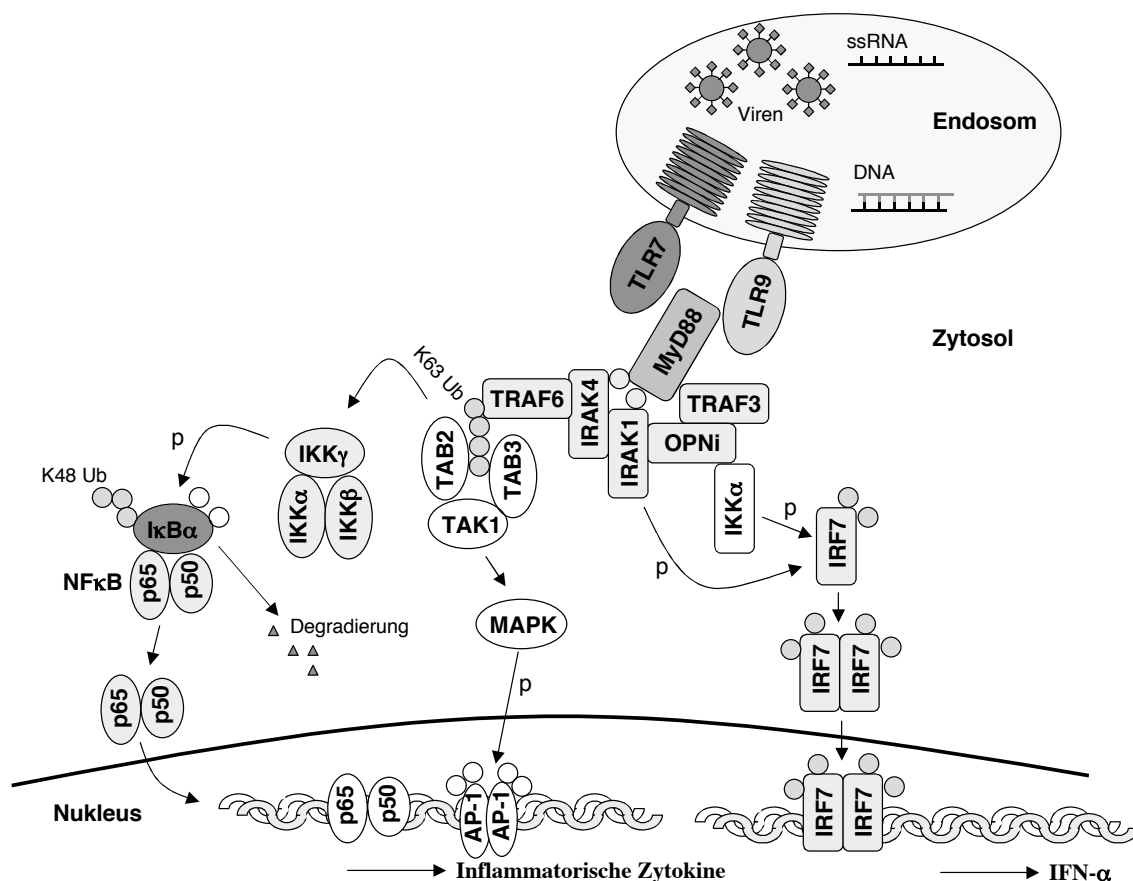
Wird eine Nukleinsäurestruktur durch TLR7 oder TLR9 gebunden, führt dies zur Rekrutierung von zytoplasmatischen Signalmolekülen, allen voran *myeloid differentiation factor 88* (MyD88). MyD88 wird unter Ausnahme von TLR3 von allen TLRs verwendet. Kinasen aus der Familie der *IL-1 receptor associated kinases* (IRAK) werden in den Signalkomplex rekrutiert. Dies betrifft vornehmlich IRAK1 und IRAK4. IRAK1 und IRAK4 unterlaufen einer Autophosphorylierung, dissoziieren von MyD88 und aktivieren ein weiteres Molekül mit dem Namen *tumor necrosis factor (TNF)-receptor (TNF-R) associated factor 6* (TRAF6). TRAF6 aktiviert dann die *inhibitor of nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) Kinase Kaskade (I- $\kappa$ B), was schließlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. Der beschriebene Weg ist für die DCs klassisch. Alternativ kommt in der plasmazytoiden dendritischen Zelle (PDC) durch die Rekrutierung von IRAK1, IRAK4, *IkappaB kinase complex* (IKK)- $\alpha$  sowie von TRAF3 und TRAF6 zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *interferon (IFN) regulatory factor-7* (IRF7). Nach Translokation von IRF7 in den Nukleus kommt es zu einer selektiven Zytokin-Induktion von Typ I IFN, insbesondere IFN- $\alpha$ . Diese Besonderheit in der Signaltransduktion der PDC erklärt die Vorreiterschaft dieser Zelle bei der Induktion von IFN- $\alpha$ .

In einigen Zelltypen werden von den TLRs weitere Signaltransduktionswege verwendet. Ein alternativer Aktivierungsweg ist die Rekrutierung der *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase Kaskade. Dies führt dann zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *activating protein 1* (AP-1) mit entsprechender Induktion von inflammatorischen Zytokinen.

Der Signaltransduktionsweg nach Erkennung über TLR3 ist MyD88-unabhängig. Vielmehr kommt es zur Rekrutierung des Adapterproteins *TIR domain-containing*

*adapter inducing IFN- $\beta$*  (TRIF). Dieser Faktor induziert MyD88-unabhängig via des *IFN regulatory factor 3* (IRF3) die Transkription von Typ I IFN.

Die Gene, die nach Bindung des TLRs exprimiert werden, kodieren für wichtige Proteine und Komponenten der angeborenen Immunität. Diese beinhalten proinflammatorische Zytokine (TNF, IL-1, IL-6, IL-12 und andere), endotheliale Adhäsionsmoleküle (E-Selektin) sowie Proteine, die bei der Tötung von Mikroben verwendet werden (induzierbare Stickoxid(NO)-Synthase). Welche dieser Strukturen exprimiert wird, hängt unter anderem vom Zelltyp ab. Abbildung 1 gibt einen Überblick über den Signaltransduktionsweg der TLRs.



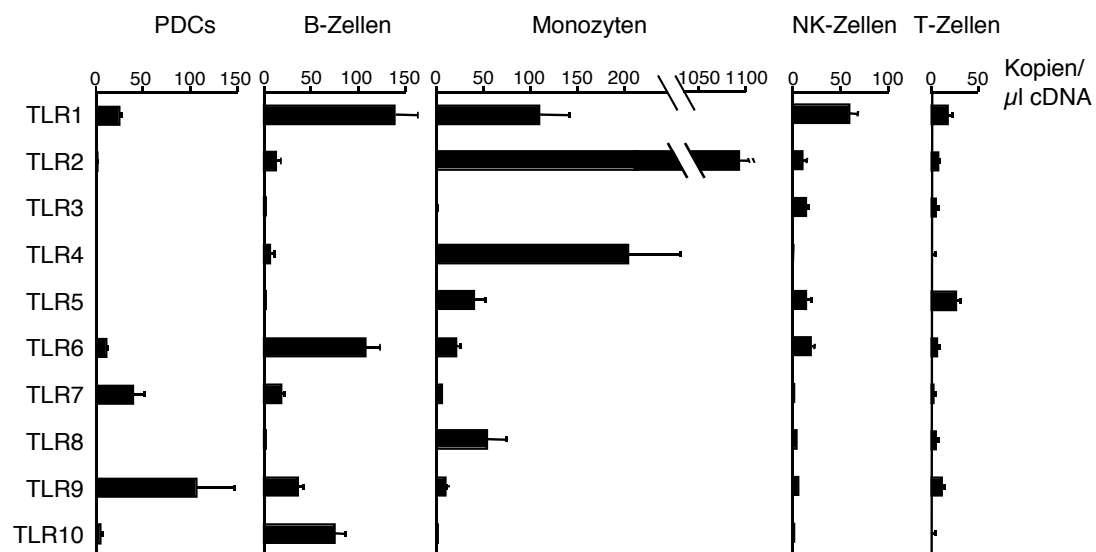
**Abb. 1 Signaltransduktion von TLR7 und TLR9**

TLR7 und TLR9 rekrutieren MyD88 und induzieren Typ I IFN und eine Immunreaktion durch die Aktivierung von IRF7 und NFκB. In PDCs formt MyD88 einen Komplex mit IRAK1, IRAK4, IKKα, TRAF3, TRAF6, *osteopontin precursor* (OPN1) und IRF7. Nach Stimulation des TLR durch den entsprechenden Liganden wird IRF7 durch IRAK1 und IKKα phosphoryliert und transloziert in den Nukleus. Es kommt zur Aufregulation von Typ I IFN, besonders IFN-α. TRAF3, IRAK1, IKKα und OPN1 sind unabkömmlich für die Aktivierung von IRF7 aber abkömmlich für die Aktivierung von NFκB. IRAK4 und TRAF6 sind hingegen für die Aktivierung beider Transkriptionsfaktoren unabkömmlich.

#### 1.1.6.3. Expressionsmuster der *Toll-like*-Rezeptoren auf den verschiedenen Immunzellen

Unsere Arbeitsgruppe beschrieb 2002 in einer Publikation erstmals das genaue Expressionsmuster für TLRs auf den verschiedenen Populationen der Immunzellen (Hornung, Rothenfusser et al. 2002).

Bezogen auf die einzelnen Zellpopulationen ergaben sich in dieser Publikation folgende charakteristische TLR-Expressionsmuster (Abbildung 2): Die TLR-Expression in PDCs war auf TLR1, TLR6, TLR7 und TLR9 beschränkt. Von allen TLRs war die Expression von TLR9 am deutlichsten. Monozyten ließen sich durch eine sehr hohe Expression von TLR2 charakterisieren, TLR1, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR8 wurden auf niedrigerem Niveau, jedoch deutlich nachweisbar exprimiert. TLR9 war ebenfalls in Monozyten zu detektieren, allerdings in wesentlich geringerer Menge als in PDCs. NK-Zellen exprimierten deutliche Mengen von TLR1 und geringe Mengen von TLR2, TLR3, TLR5 und TLR6. Die TLR-Expression in T-Zellen war allgemein niedrig, wobei TLR1 und TLR5 die am deutlichsten nachweisbaren TLR-Moleküle waren. Sowohl in NK-Zellen als auch in T-Zellen konnten geringe Mengen TLR9 auf *messenger* (mRNA)-Ebene nachgewiesen werden. Die erhobenen Ergebnisse wurden in den darauf folgenden Jahren durch mehrere Publikationen bestätigt (Hart, Athie-Morales et al. 2005; Gorden, Qiu et al. 2006; Gorski, Waller et al. 2006).



**Abb. 2 Quantitative Analyse der TLR1-10 mRNA-Expression in PDCs, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen**

Die Abbildung entstammt der Dissertation von Veit Hornung, Ludwig-Maximilians-Universität München, und wurde freundlicherweise für die Verwendung in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt. Isolierte PDCs, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen wurden kultiviert. Die zytoplasmatische RNA der Zellen wurde dann extrahiert und mit reverser Transkription umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde in einer *Real-time*-PCR mit Primerpaaren für TLR1-10 eingesetzt. Aus den erhaltenen Daten wurde jeweils der Mittelwert gebildet und der SEM berechnet.

#### 1.1.6.4. *Toll-like*-Rezeptor-unabhängige Erkennung

Einige bakterielle Bestandteile werden TLR-unabhängig durch zytosolische Rezeptoren erkannt. Hierzu zählen die bereits angesprochenen NOD-*like* Rezeptoren (NLRs) genauso wie die RIG-I-*like helicases* (RLHs).

NLRs besitzen eine zentrale NOD, C-terminale *leucine-rich repeats* (LRR) sowie N-terminal eine für die Signaltransduktion verantwortliche Domäne *caspase recruit domain* (CARD) oder PYD (PYRIN-Domäne). NOD1 und NOD2 besitzen eine N-terminale CARD und erkennen Bestandteile von bakteriellem Peptidoglykan (Chamaillard, Hashimoto et al. 2003; Girardin, Boneca et al. 2003). Andere Mitglieder der NLRs, wie die NALP-(*NACHT domain, LRR domain, and PYD containing protein*)-Familie, besitzen anstatt der CARD eine PYD. Die NALP-Familie beinhaltet 14 Proteine, die genaue Funktion der meisten NALPs ist jedoch nicht bekannt. Einige der NALPs sind Teil des sogenannten Inflammasoms. Das Inflammasom ist ein zytosolischer Proteinkomplex in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, der durch Bestandteile von Bakterien stimuliert wird. Im Verlauf dieser Erkennung kommt es zur Aktivierung von Caspase-1, diese wiederum aktiviert das Zytokin IL-1 $\beta$  und IL-18 durch Spaltung der inaktiven Vorstufen dieser Zytokine.

Entgegen der NLRs sind die RLHs entscheidend für die Erkennung viraler Strukturen. Wie NLRs sind sie im Zytosol lokalisiert. Wichtige Mitglieder dieser Rezeptorgruppe sind RIG-I und *melanoma differentiation-associated gene-5* (Mda5). RIG-I und Mda5 besitzen N-terminal CARD und C-terminal eine Helikasedomäne. Die Helikasedomäne der RLHs besitzt Ähnlichkeiten mit den Dicerproteinen. Diese Helikasen sind bei der Generierung von *small interfering RNA* (siRNA) von entscheidender Bedeutung. Wie TLRs und NLRs sind auch die RLHs stark konserviert und bei allen finden sich verwandte Gene in *C. elegans*. Der Ligand für RIG-I ist virale RNA mit einem Triphosphat am 5'-Ende (Hornung, Ellegast et al. 2006). RIG-I erkennt über dieses Motiv eine Reihe verschiedener Viren, darunter Paramyxo- und Orthomyxoviren. Mda5 erkennt unter anderem Picornaviren. Welches Motiv oder welche molekulare Struktur für die Erkennung über Mda5 verantwortlich ist, ist bisher nicht bekannt (Kato, Takeuchi et al. 2006).

## 1.2. Effektormechanismen der angeborenen Immunität

Wird ein Pathogen bzw. dessen Struktur durch das Immunsystem erkannt und als bedrohlich eingestuft, kommt es zur Rekrutierung von Mechanismen, die gegen diese Bedrohung alleine oder in Kombination angehen. Diese werden allgemein als Effektormechanismen des Immunsystems zusammengefasst und beinhalten sowohl Zellen und Zellverbände als auch lösliche Proteine. Letztere sind insbesondere für die Kommunikation der Zellen untereinander maßgeblich und werden unter dem Begriff Zytokine zusammengefasst. Unter dem Begriff Effektorzellen werden in dieser Arbeit vornehmlich solche Zellen verstanden, die letztlich für die Zytolyse und damit für das Abtöten einer angegriffenen Zelle verantwortlich sind. Dies sind vor allem CTLs und NK-Zellen.

Ein pathogener Stimulus, der zu einer Immunantwort führt, aktiviert in den seltensten Fällen nur einen isolierten Effektormechanismus. Für eine effiziente Immunantwort ist es vielmehr typisch und von entscheidender Bedeutung, dass entsprechend eines spezifischen pathogenen Stimulus mehrere Effektormechanismen miteinander orchestrieren. In dem folgenden Abschnitt werden zunächst die Zytokine und die NK-Zellen als wichtige Effektormechanismen des Immunsystems abgehandelt. In späteren Abschnitten werden des Weiteren die bemerkenswerte Stellung der DCs bei der Immunabwehr sowie der T-Zellen besprochen.

### 1.2.1. Zytokine

Als Zytokine wird eine Gruppe von Proteinen bezeichnet, die vor allem die Zell-zu-Zell Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems regelt. Wie in anderen Bereichen der Zell-Kommunikation kann die Informationsvermittlung durch Zytokine autokrin, parakrin und, in einigen seltenen Fällen, auch endokrin erfolgen. Neben der erwähnten regulatorischen Funktion besitzen einige Zytokine zusätzlich direkte immunologische Effektorfunktionen, dies trifft zum Beispiel für die weiter unten beschriebenen Interferone zu.

Zytokine sind allgemein mit einem Molekulargewicht von meist unter 30kDa eher kleine Proteine. Sie binden spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Nach Triggerung der Signaltransduktion kommt es letztlich zur Regulation der Genexpression der Zielzelle. Die Empfänglichkeit einer Zelle für ein über ein Zytokin vermitteltes Signal wird über das Vorhandensein des spezifischen Zytokin-Rezeptors bestimmt. Zytokine

und ihre spezifischen Rezeptoren besitzen eine hohe Affinität, die Dissoziationskonstante liegt zwischen  $10^{-10}$  und  $10^{-12}$  Molar. Aufgrund der hohen Affinität können biologische Effekte bereits auf picomolare Konzentrationen erfolgen.

Strukturell können innerhalb der Zytokine vier Untergruppen unterschieden werden: Die Mitglieder der Hämatopoietin-Familie besitzen regulatorische Funktionen bei der Hämatopoese. Die Chemokine sind unter anderem für die Chemotaxis der Leukozyten verantwortlich. Die Untergruppe der TNF-Familie besitzt wie die Interferone eine Vielzahl regulatorischer Funktionen bei der Immunantwort. Interferone haben darüber hinaus zusätzlich direkte immunologische Effektorfunktionen. Neben dieser Einteilung lässt sich ebenfalls die wichtige Gruppe der Interleukine (IL) abgrenzen. Als Interleukin werden solche Zytokine bezeichnet, die vornehmlich von Leukozyten sezerniert werden und auf Leukozyten wirken.

Im Folgenden sollen die Interleukine und die Interferone ausführlicher besprochen werden.

#### 1.2.1.1. Interleukine und die IL-12-Familie

Zu der Gruppe der Interleukine gehören derzeit etwa 35 verschiedene Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen. Eine wichtige Funktion der Interleukine ist es zunächst, eine Immunreaktion zu triggern. IL-2 wird von T-Zellen gebildet und ist eines der wichtigsten T-Zell-aktivierenden Interleukine. Es bewirkt autokrin und parakrin das Wachstum und die Reifung von T-Zellen. Darüber hinaus wird auch die Qualität der Immunreaktion, abhängig durch die Art des immunologischen Stimulus, bereits auf Ebene der Interleukine reguliert. Nach entsprechendem Stimulus führt IL-4 zu einer  $T_H2$ -gerichteten humoralen Immunantwort, wie sie für Allergien oder einige chronische Erkrankungen typisch sind. IL-12 dagegen ist für die Induktion einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort entscheidend, wie sie bei viralen Infektionen oder bei der immunologischen Reaktion gegenüber maligne-entarteten Zellen wichtig ist. Andere Interleukine haben demgegenüber eine hauptsächlich immuninhibitorische Wirkung. Ein prominenter Vertreter ist das IL-10. Es wird von  $T_H2$ -Zellen, B-Zellen und Makrophagen gebildet.

Interleukine werden fortlaufend nummeriert, viele Interleukine und deren Funktion sind erst kürzlich identifiziert worden. Es ist zu erwarten, dass in naher Zukunft weitere Proteine aufgrund ihrer Funktion in die Gruppe der Interleukine eingruppiert werden

müssen. In den folgenden Ausführungen der Interleukine wird die zentrale Rolle des IL-12 bei der Induktion einer T<sub>H</sub>1-gerichteten, zellulären Immunantwort verdeutlicht.

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin bestehend aus zwei über Disulfid-Bindungen verbundenen Untereinheiten; der leichten Kette IL-12p35 (p35) und der schweren Kette IL-12p40 (p40) (Gately, Desai et al. 1991; Gubler, Chua et al. 1991). Die p40 Untereinheit ist den Zytokin-Rezeptoren homolog, die p35 Untereinheit dagegen besitzt strukturelle Ähnlichkeiten mit IL-6 und *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) (Merberg, Wolf et al. 1992). Die zu kodierenden Gene für die zwei Untereinheiten befinden sich beim Menschen auf Chromosom 3 und 5, bei der Maus auf Chromosom 6 und 11. Die Verteilung auf zwei verschiedenen Chromosomen bedingt, dass die zwei Untereinheiten unterschiedlich reguliert werden. Werden die zwei Untereinheiten zeitgleich in der selben Zelle exprimiert, bildet sich das biologisch aktive Heterodimer IL-12p70 (p70) (Gubler, Chua et al. 1991). Neben IL-12p35 kann IL-12p40 auch mit anderen Untereinheiten assoziieren, so bildet die heterodimere Verbindung aus IL-12p40 und p19 das IL-23 (Oppmann, Lesley et al. 2000). Bei der experimentellen Analyse der Funktionen von IL-12 ist es daher unabdingbar, lediglich die biologisch aktive Komponente IL-12p70 zu bestimmen. Durch eine Messung der IL-12p40- oder IL-12p35-Untereinheit kann keine Aussage über die tatsächliche Menge von aktivem IL-12 gemacht werden. Zusammen mit IL-27p28, einem weiteren Dimer aus *Epstein-Barr-Virus-induced gene 3* (EBI3) und der Untereinheit p28, werden IL-12 und IL-23 als IL-12-Familie zusammengefasst (Trinchieri 2003).

Der IL-12-Rezeptor (IL-12R) besteht aus zwei Ketten, IL-12R $\beta$ 1 und IL-12R $\beta$ 2 (Presky, Yang et al. 1996). Letztere Kette ist für die Signaltransduktion verantwortlich und aktiviert den *Janus kinase signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) Weg der Signaltransduktion. Die durch Stimulation des IL-12R hervorgerufenen zellulären Effekte werden vornehmlich der Aktivierung von STAT4 zugeschrieben, denn STAT4-defiziente Mäuse haben einen identischen Phänotyp wie Mäuse defizient für IL-12p40 (Kaplan, Sun et al. 1996; Thierfelder, van Deursen et al. 1996). IL-12R wird vor allem auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen exprimiert, aber auch auf DCs und auf B-Zellen (Presky, Yang et al. 1996; Grohmann, Belladonna et al. 1998; Airoidi, Gri et al. 2000). Auf naiven T-Zellen wird kein IL-12R exprimiert, wohl aber geringe Mengen auf naiven NK-Zellen. Dies könnte eine Erklärung für die Beobachtung sein, dass letztgenannte Zellen besonders schnell auf IL-12 reagieren.

IL-12 ist als Produkt der aktivierten Entzündungszellen Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mikroglia und DCs bekannt. Die Produktion von IL-23 und



IL-27 ist bisher nicht im Detail untersucht worden, es zeichnet sich jedoch ab, dass diese Zytokine durch ähnliche Stimuli induziert werden und dass auch dieselben Zellen für die Produktion verantwortlich sind wie für IL-12 (Oppmann, Lesley et al. 2000). Zusammen mit dem weiter unten beschriebenen Typ I IFN ist IL-12 das wichtigste Zytokin für die frühe Induktion einer  $T_H1$ -gerichteten Immunreaktion. Als  $T_H1$ -gerichtete Immunreaktion wird die Aktivierung und Rekrutierung solcher Bestandteile des Immunsystems verstanden, die zu einer zellulär vermittelten, lokalen Abwehrreaktion führt. So führt typischerweise die maligne Entartung einer Zelle oder die Infektion einer Zelle mit einem Virus zur Aktivierung von DCs, Makrophagen, NK-Zellen und CTLs. Das IL-12 ist ein starker Stimulus für T-Zellen und NK-Zellen und induziert in diesen Zellen das weiter unten beschriebene IFN- $\gamma$ . Die Aktivierung von NK-Zellen und T-Zellen führt zu einer tatsächlichen Lyse und damit zur Elimination der befallenen Zellen. IL-12 kommt somit eine essentielle Rolle bei der Überbrückung von angeborener zu adaptiver Immunität zu.

Interessant ist, dass ursprünglich angenommen wurde, dass vor allem die frühe Induktion von IL-12 durch DCs unabhängig von IFN- $\gamma$  erfolgt. Die Erkenntnisse für diese Aussage begründen sich durch Arbeiten mit *Toxoplasma gondii*. Mittlerweile konnte aber gezeigt werden, dass die Induktion von IL-12 durch *Toxoplasma gondii* andere sind als die für die TLR-Aktivierung (Aliberti, Reis e Sousa et al. 2000). Daher sind diese Ergebnisse kürzlich in Frage gestellt worden (Trinchieri 2003). Momentan vermehren sich die Hinweise, dass IFN- $\gamma$  auch in der frühen Phase der IL-12-Produktion durch DCs eine wichtige Rolle spielt (Moretta, Marcenaro et al. 2005).

Das Konzept der komplexen Interaktion zwischen IL-12, NK-Zellen und DCs bei der Induktion einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort ist unter Abschnitt 1.4 beschrieben.

#### 1.2.1.2. Interferone

Interferone (*interferons*, IFN) sind im Organismus natürlicherweise vorkommende Proteine. Sie können in die große Familie der glykoproteinerger Zytokine gruppiert werden. Ihre Bedeutung für die Immunabwehr erlangen die Interferone, weil sie in löslicher Form nach adäquater Stimulation von Immunzellen sezerniert werden können und Effektorfunktionen übernehmen. Die am weitesten erforschte Funktion der Interferone ist es, den viralen Replikationszyklus zu hemmen. Sie tragen damit eine ausschlaggebende Rolle bei der Abwehr von viralen Infektionen.

Die Entdeckung der Interferone geht bereits über ein halbes Jahrhundert zurück. 1957 wurde von Isaacs und Lindenmann ein Protein beschrieben, dass in lebenden Zellen nach Stimulation mit Hitze-inaktivierten Influenzaviren induziert wurde und mit der viralen Replikation dieses Virus interferierte (Isaacs and Lindenmann 1957). Die Entdeckung durch Isaacs und Lindenmann erhielt in dem damaligen Forscherfeld enorme Aufmerksamkeit und die beiden Forscher gelten bis heute als die Entdecker dieser wichtigen Proteingruppe. Die genaue Recherche der Literatur zeigt jedoch, dass die Interferone bereits drei Jahre zuvor durch zwei japanische Forscher entdeckt worden waren. Bei dem Versuch, einen Impfstoff gegen die Pocken zu entwickeln, inaktivierten sie Viren durch UV-Strahlung und brachten sie auf Hasenhaut auf. Nach erneuter Infektion dieser Gebiete beobachteten sie ein gehemmtes virales Wachstum. Die Forscher untersuchten die gemachte Beobachtung durch Fraktionierung der UV-inaktivierten Homogenate und durch Ultrazentrifugation. Schließlich beschrieben sie einen inhibitorischen Faktor als Ursache ihrer Beobachtung und publizierten ihre Ergebnisse 1954 in der französischen Fachzeitschrift *Journal de la Société de Biologie* (Nagano und Kojima 1954). Sie hatten die Interferone beschrieben, erhielten jedoch dafür nicht die Anerkennung, die drei Jahre später den Forschern Isaacs und Lindenmann zukommen sollte. Als Grund dafür wird angenommen, dass die komplizierten Versuchsreihen von Nagano und Kojima schwer nachzuvollziehen waren.

Seit der ursprünglichen Entdeckung zeigte sich, dass mehrere IFN-Subtypen existieren, so dass man heute von einer Protein-Familie spricht. Die Interferone können in Typ I IFN und Typ II IFN unterteilt werden. Diese zwei Gruppen von Interferonen werden von verschiedenen Zellen produziert und binden an unterschiedliche Rezeptoren (Farrar and Schreiber 1993; Pestka 2000).

Die Familie des Typ I IFN setzt sich aus mindestens 13 verschiedenen IFN- $\alpha$ -Subtypen, einem IFN- $\beta$  und einem IFN- $\omega$  zusammen. Diese Familie wird hauptsächlich als antivirale Proteinklasse angesehen, da sie besonders im Rahmen einer viralen Infektion gebildet wird und virale Resistenz in Zielzellen bewirkt. Typ I IFN werden rasch auf mikrobielle Stimuli hin sezerniert und aktivieren eine Vielzahl von Effektorzellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Dem Typ I IFN werden eine Vielzahl von Funktionen zugerechnet. Es inhibiert unter anderem direkt eine Virus-Replikation in infizierten Zellen und steigert die Zytotoxizität von Makrophagen und NK-Zellen (Isaacs, Lindenmann et al. 1957). Es fördert die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen durch die Induktion von IL-15 und erhält

aktivierte T-Zellen am Leben (Zhang, Sun et al. 1998). Darüber hinaus begünstigt Typ I IFN ferner die Antikörperproduktion durch B-Zellen (Le Bon, Schiavoni et al. 2001). Im Besonderen ist Typ I IFN unabdingbar in der Induktion einer effektiven, spezifischen, antiviralen Immunität und spielt auch in der Immunantwort gegen Bakterien und Protozoen eine entscheidende Rolle (Bogdan 2000).

IFN- $\gamma$  ist der einzige Vertreter des Typ II IFN und wird hauptsächlich von T-Zellen oder NK-Zellen gebildet, die durch Antigene oder Zytokine stimuliert werden. Dieses Interferon wurde intensiv in sowohl normalen als auch pathologischen Immunantworten untersucht. Das IFN- $\gamma$  wird heute als das wichtigste immunregulatorische Protein der IFN-Familie angesehen (Billiau 1996). Das Zytokin ist ein typisches Produkt einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort. IFN- $\gamma$  besitzt die Fähigkeit, in verschiedenen Zellen die Expression der für die Präsentation von Antigenen essentiellen MHC-II-Moleküle zu induzieren. Darüber hinaus bewirkt IFN- $\gamma$  in Makrophagen eine gesteigerte Leistung bei der Zerstörung von Tumorzellen und der Abtötung von intrazellulären Erregern. Auch leitet es in B-Zellen den Klassenwechsel von Immunglobulin(Ig)M zu IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>3</sub> ein. IFN- $\gamma$  ist der wichtigste Makrophagen-aktivierende Faktor (MAF). Schließlich steigert IFN- $\gamma$  die Aktivität von NK-Zellen und hemmt die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen.

### 1.2.2. Natürliche Killerzellen

Die Zellpopulation der NK-Zellen wurde 1976 erstmals beschrieben. Bei dem Versuch, die *in vitro* Aktivität von tumorspezifischen Mauszellen zu messen, kam es zu einer überraschenden Entdeckung. Unter den Zellen der Kontrollgruppen von nicht-immunisierten Mäusen sowie von Mäusen, die für einen nicht verwandten Tumor präpariert waren, kam es zu einer erheblichen Tumorlyse. Eine Charakterisierung der Zellpopulation, die für diese Tumorlyse verantwortlich war, identifizierte eine Population von großen, granulären Lymphozyten. Diese Zellen wurden Natürliche Killerzellen (*natural killer cells*) genannt, weil sie entgegen den T-Lymphozyten ohne vorhergehende Sensibilisierung Tumorzellen zu lysieren vermochten. Dieses rein funktionelle Kriterium blieb lange das einzige Klassifizierungsmerkmal, wobei Näheres zu ihrer Herkunft und den molekularen Mechanismen ihrer Funktion verborgen blieb (Trinchieri 1989).

Die NK-Zellen stellen bis zu 5% des gesamten Lymphozytenpools dar und sind zentraler Bestandteil der Immunreaktion gegen virale Infektionen und Tumoren. Weil NK-Zellen darüber hinaus auch immunologisch wichtige Zytokine produzieren,

übernehmen sie regulatorische Funktionen und beeinflussen die angeborene und adaptive Immunität gleichermaßen. Als zentrales Zytokin kann das IFN- $\gamma$  angesehen werden. Die Sekretion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen stimuliert die phagozytische Aktivität unter anderem von Makrophagen in der frühen Phase der Immunreaktion. Darüber hinaus führt IFN- $\gamma$  zur Ausrichtung einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunantwort. Dies geschieht durch inhibitorische Effekte auf die T-Helferzellpopulation und eine Induktion von IL-12 durch Makrophagen und DCs.

NK-Zellen übernehmen somit eine wichtige Rolle während der frühen Phase einer Abwehrreaktion gegen Viren und einigen intrazellulären Bakterien. Die NK-Zellaktivität wird unter anderem durch IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IL-12 gesteigert. Während einer viralen Infektion kommt es zu einem schnellen Anstieg von Zytokinen, gefolgt von einer Welle von NK-Zellen etwa drei Tage später. NK-Zellen kontrollieren die Virusreplikation in der Zeit, die zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der Zellen des adaptiven Immunsystems benötigt wird.

Die Bedeutung der NK-Zellen für die Integrität des Organismus kann durch das Chediak-Higashi Syndrom verdeutlicht werden. Der seltenen, autosomal-rezessiven Erberkrankung liegt unter anderem ein Defekt der NK-Zellen zugrunde. Patienten mit diesem Syndrom haben eine verkürzte Lebensdauer und versterben meist schon im Kindesalter an einer Vielzahl von Infektionen. Auch ist die Anfälligkeit gegenüber der Entwicklung von Leukämien und Lymphomen bei diesen Patienten stark erhöht. Eine junge Patientin, die unabhängig des genannten Syndroms einzigartigweise zwar mit funktionellen T- und B-Zellen jedoch ohne jegliche NK-Zellpopulation geboren wurde, verstarb in jungen Jahren an wiederholten, fulminanten Herpesvireninfektionen (Biron, Byron et al. 1989).

Die NK-Zellen weisen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede mit den T-Lymphozyten auf. NK-Zellen tragen im Gegensatz zu den T-Zellen keinen T-Zell-Rezeptor (TZR), auch weisen sie auf ihrer Oberfläche keine Immunglobuline auf. Morphologisch sind NK-Zellen etwas größer als die T- und B-Lymphozyten und verfügen in jeder ihrer Aktivierungsstadien über reiche, azurophile Granula. Deshalb werden sie hin und wieder als große, granulozäre Lymphozyten bezeichnet. Verschiedene NK-Zellen exprimieren verschiedene Kombinationen von Oberflächenmarkern, wobei nicht genau verstanden ist, ob diese Heterogenität verschiedenen Subpopulationen oder unterschiedlichen Entwicklungs- oder Aktivierungsstadien entspricht.

Mehrere Untersuchungen konnten mittlerweile zeigen, dass NK- und T-Zellen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle abstammen (Mingari, Poggi et al. 1991; Rodewald, Moingeon et al. 1992). Die genaue Differenzierung während der Hämatopoese ist jedoch nicht aufgeklärt. Trotz einiger Gemeinsamkeiten mit den T-Zellen ist klar geworden, dass NK-Zellen zumindest nicht ausschließlich im Thymus generieren. Mäuse, die keinen Thymus besitzen, haben nur eine geringe Menge an T-Lymphozyten, aber funktionelle NK-Zellpopulationen. NK-Zellen durchlaufen kein Rearrangement der für die Rezeptoren kodierenden Gene. Dies konnte eindrucksvoll durch die Untersuchungen an Mäusen gezeigt werden, denen die Rekombinase-Gene RAG-1 und RAG-2 fehlen. Selbst unter diesen Bedingungen entwickeln sich in den entsprechenden Mäusen funktionelle NK-Zellen.

NK-Zellen exprimieren einige Oberflächenmarker, die ebenfalls auf Monozyten und Granulozyten sowie auf T-Zellen zu finden sind. Weil NK-Zellen keinen TZR tragen, besitzen sie auch kein für die T-Zellen charakteristisches CD3. CD3 stellt letztlich eine Unterkomponente des TZRs dar, die für die intrazelluläre Signaltransduktion dieses Rezeptors verantwortlich ist. Die Oberflächenmarker CD16 und CD56 gelten als klassische NK-Zell-Charakteristika. CD56 gilt als spezifisch für die NK-Zellen, wird aber auch auf einigen seltenen Subpopulationen von anderen Lymphozyten gefunden. Die Bedeutung von CD56 für das Immunsystem ist bis heute unverstanden. Viel genauer charakterisiert ist die zentrale Stellung des Oberflächenmarkers CD16. CD16 kommt neben den NK-Zellen ebenfalls auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vor. Dieser Rezeptor erkennt das Fc-Stück von Antikörpern der Klasse G. Im Rahmen einer Immunreaktion werden von den Plasmazellen spezifische Antikörper gegen Antigene auf den zu eliminierenden Zellen gebildet. Haben diese Antikörper die Zelle gebunden, wird das offene Fc-Stück dieser Antikörper durch die CD16-tragenden Zellen erkannt. Dies gilt als Signal, die erkannte Zelle zu eliminieren, und wird als Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität (ADCC) bezeichnet. Alle genannten Zellen, die CD16 auf ihrer Oberfläche tragen, sind wie die NK-Zellen zur ADCC fähig. Dieser Mechanismus lässt sich auch als indirekt-adaptiv bezeichnen, weil die NK-Zellen auf die eigentliche Antigenerkennung durch die Antikörper keinen Einfluss nehmen und lediglich als verlängerter Arm der adaptiven Immunantwort die Zielzellen lysieren. Für die letztendliche Lyse der Zellen spielen mehrere Mechanismen eine Rolle. Ihnen gemeinsam ist, dass sie nicht über das Komplement vermittelt werden. Der wichtigste Mechanismus ist die Exozytose von zytoplasmatischen Granula. Diese Granula enthalten eine große Zahl von Proteinen wie Perforine und Granzyme, welche

die Zielzelle zu lysieren vermögen. Die Sekretion von TNF ist für die Zelllyse der Zielzelle ebenso ausschlaggebend wie die Aktivierung der Stickoxid-Signalkette.

Eine weitere wichtige Besonderheit von NK-Zellen sind ihre aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Aktivierende Rezeptoren sind solche, welche die NK-Zelle zur Zytotoxizität stimulieren, inhibitorische Rezeptoren sind solche, die sie im Falle der adäquaten Bindung davon abhält. Ein Signal eines inhibitorischen Rezeptors hat immer „Veto-Macht“ gegenüber einem Signal eines aktivierenden Rezeptors. Die Gruppe der aktivierenden Rezeptoren (*killer activating receptors*, ARs) ist groß und heterogen. Ihnen gemeinsam ist, dass sie durch solche Moleküle und Strukturen aktiviert werden, die auf Virus-infizierten Zellen exprimiert werden oder Produkte von Viren selbst darstellen. Einige der ARs sind Zucker-bindende Proteine des Typ-C-Lektins. *Natural killer receptor-p1* (NKR-P1) ist ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe. Darüber hinaus gehören weitere Rezeptoren in die Gruppe der ARs, zum Beispiel das Molekül CD2, den Rezeptor für das Adhäsionsmolekül LFA-3. Weitere sind die ARs NKp30, NKp44 und NKp46.

Diesen gegenüber stehen die Signale der inhibitorischen Rezeptoren. Zwei Hauptgruppen dieser Rezeptoren sind bekannt. Zum einen die Typ-C-Lektin inhibitorischen Rezeptoren (*C-type-lectin inhibitory receptors*, CLIR) und die Killer inhibitorischen Rezeptoren (*killer inhibitory receptors*, KIRs). Beide Gruppen haben die Fähigkeit, die zur Präsentation nötigen MHC-I-Moleküle zu binden. MHC-I-Moleküle kommen unter normalen Umständen auf allen kernhaltigen Zellen vor und führen zu einem Signal, das die NK-Zelle hemmt. Somit ist gewährleistet, dass eine Zelle, die MHC-I-Moleküle normaler Quantität und Qualität exprimiert, allen NK-Zell-vermittelten Lysemechanismen jederzeit entgehen kann. Kommt es jedoch im Rahmen von viralen Infektionen oder maligner Entartungen von Zellen zu einem veränderten Expressionsmuster der MHC-I-Moleküle und wird zusätzlich ein aktivierendes Signal erkannt, wird diese Zelle eliminiert (*missing self* Theorie, (Ljunggren and Karre 1990)).

Als einen dritten Mechanismus zur Zellelimination von bedrohlichen Zellen trägt die NK-Zelle einen Fas-Liganden (FasL). Zellen, die aus regulatorischen Gründen ein Ableben zum Wohle des Gesamtorganismus vorziehen, exprimieren auf ihrer Oberfläche Fas-Moleküle. NK-Zellen binden über den FasL die Zelle und lösen so die Apoptose der Zielzelle aus.

Die Hauptcharakteristika und Funktionen von NK-Zellen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Hauptcharakteristika/ Funktionen	Referenz
Im Gegensatz zu CTLs exprimieren NK-Zellen konstitutiv eine „lytische Maschinerie“ und lysieren Zielzellen MHC-unabhängig, ohne vorausgegangene <i>in vitro</i> - oder <i>in vivo</i> -Aktivierung.	(Trinchieri 1989)
Virus-infizierte und maligne-transformierte Zellen mit mangelnder MHC-I-Expression werden von NK-Zellen lysiert.	(Ljunggren and Karre 1990; Yokoyama 1993; Moretta, Bottino et al. 1996; Lanier 1998; Biron, Nguyen et al. 1999)
Nach Aktivierung produzieren NK-Zellen verschiedene Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ und GM-CSF) und Chemokine, die eine Entzündungsantwort fördern und eine Immunantwort in Richtung T <sub>H</sub> 1 modulieren.	(Trinchieri 1995; Biron, Nguyen et al. 1999)
NK-Zellen beteiligen sich an der Eradikation verschiedener Pathogene durch Mechanismen der ADCC	(Trinchieri 1989; Trinchieri 1995)
Im murinen System werden durch NK-Zellen Tumorwachstum und Metastasierung gehemmt.	(Kim, Iizuka et al. 2000)

**Tab. 2            Hauptcharakteristika und Funktionen von NK-Zellen mit entsprechender Referenz**

## 1.3. Effektormechanismen der adaptiven Immunität

### 1.3.1. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten erhalten ihren Namen aufgrund des Ortes ihrer Reifung im Thymus, wo sie aus unreifen Vorstufen gebildet werden. Im Blut stellen die T-Lymphozyten mit einem Anteil von ca. 60-70 % die größte Lymphozytenpopulation aller mononukleären Zellen dar. Darüber hinaus befinden sich T-Lymphozyten in den T-Zell-Arealen der peripheren Lymphknoten sowie der periarteriolen Milzsinusoide. Die Segregation der naiven T-Zellen in diese anatomischen Orte findet durch die Expression von Chemokin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche statt. Die entsprechenden Chemokine werden vor allem in den lymphoiden Regionen gebildet und lenken so Zellen durch Bindung ihrer Liganden an ihr Ziel (Cyster 1999; Mebius 2003).

Jeder T-Lymphozyt ist genetisch darauf programmiert, ein zellgebundenes Antigen spezifisch über einen TZR zu erkennen (Davis, Boniface et al. 1998). In 95% der Fälle besteht der TZR aus einem über eine Disulfid-Brücke verbundenen Heterodimer bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Polypeptidkette. Beide Ketten besitzen eine variable, Antigen-bindende und eine konstante Region. Der  $\alpha\beta$ -TZR erkennt Peptid-Antigene, die über den MHC-Komplex auf der Oberfläche von APCs dargeboten werden (Hennecke and Wiley 2001). T-Lymphozyten vermögen kein lösliches Antigen zu erkennen. Die Präsentation von prozessiertem, membrangebundenem Antigen durch die APC ist daher unabdingbar für die Induktion der Zell-vermittelten Immunität.

T-Lymphozyten tragen klassischerweise die TZR-Unterkomponente CD3 auf ihrer Oberfläche und lassen sich durch diesen Marker einfach charakterisieren. CD3 ist, wie bereits angesprochen, für die intrazelluläre Signaltransduktion nach Bindung an den TZR verantwortlich. Zusätzlich zu CD3 exprimieren T-Lymphozyten eine Reihe weiterer charakteristischer funktionell assoziierter Moleküle auf ihrer Oberfläche.  $\alpha\beta$ -T-Zellen sind entweder durch den Oberflächenmarker CD4 oder CD8 gekennzeichnet. Diese Oberflächenmarker sind Korezeptoren des TZR, sie binden zusätzliche Signalmoleküle und sind für Regulation und Signaltransduktion unerlässlich. An der Erkennung von auf den MHC-Molekülen präsentierten Antigenen sind sie jedoch nicht beteiligt. Der TZR-Komplex erkennt in Assoziation mit dem CD4-Korezeptor solche Antigene, die über MHC-II präsentiert werden, und führt zur Differenzierung des T-Lymphozyten zur regulatorischen T-Helferzelle. Die T-Helferzelle führt zur Ausreifung der B-Zelle zur Antikörper-sekernierenden Plasmazelle, ist also für die Induktion einer humoralen



(Antikörper-basierten) Immunantwort wichtig. Der CD8-Korezeptor-TZR-Komplex erkennt Antigene, welche über MHC-I präsentiert werden. Entsprechende Bindung führt zur Differenzierung des T-Lymphozyten zur CTL. Die CTLs sind, ähnlich den NK-Zellen, Effektorzellen und führen zu einer Zerstörung der Zielzellen. Im Unterschied zu den NK-Zellen, dessen Mechanismus über ADCC als indirekt Antigen-spezifisch beschrieben wurde, erfolgt die Lyse der Zielzelle durch die CTLs direkt Antigen-spezifisch. Ähnlich der Zelllyse hervorgerufen durch die NK-Zellen verwendet die CTL Zytolysine, lytische Enzyme, TNF und Perforine als Lyse-Mechanismen. In beiden Fällen wird in der Zielzelle durch diese Mechanismen die Apoptose der Zielzelle eingeleitet und die Zelle somit eliminiert.  $\alpha\beta$ -T-Zellen können also als Gesamtsystem durch ihr TZR-Repertoire eine nahezu unendliche Zahl an Fremd-Peptiden erkennen und somit zu deren Eliminierung beitragen. Sie spielen damit die zentrale Rolle in der Abwehr gegen viele pathogene Bakterien, Parasiten, Viren und Tumoren, sind allerdings auch hauptverantwortlich für Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin.

Ein geringer Teil der T-Lymphozyten exprimiert anstatt der erwähnten  $\alpha\beta$ -Ketten des TZRs einen TZR, der aus jeweils einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette besteht (Hayday 2000). Diese  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten erkennen Peptide, Lipide und kleine Moleküle ohne die für die T-Zellen typische vorherige Antigen-Präsentation über die MHC-Moleküle. Die *Killing*-Mechanismen sind ähnlich den oben beschriebenen.  $\gamma\delta$ -T-Zellen akkumulieren auf epithelialen Oberflächen wie etwa der Mukosa des Respirations- oder des Gastrointestinaltrakts. Daher wird ihnen eine wichtige Rolle bei der Ersterkennung von eindringenden Mikroben und mikrobakteriellen Strukturen zugeschrieben.

## 1.4. Dendritische Zellen und die Regulation von angeborener und adaptiver Immunität

Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) erlangen ihren Namen aufgrund ihrer langen, membranösen Ausläufer, die stark den Dendriten von Nervenzellen ähneln. Je nach Klassifizierung ist eine Vielzahl von Subtypen von DCs beschrieben. Den verschiedenen Typen der DCs ist die Antigen-Präsentation als wichtigste Aufgabe gemeinsam (Banchereau, Briere et al. 2000). Die unterschiedlichen Zelltypen stammen der hämatopoetischen Stammzelle ab, durchlaufen aber jeweils eine andere Abstammungslinie. Ein objektives morphologisches Kriterium, welches die eindeutige Zuordnung einer Zelle in die DC-Population erlaubt, ist bis dato nicht verfügbar. Gängigerweise werden die DCs nach funktionellen Gesichtspunkten klassifiziert. DCs liegen in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers in einem dichten Netzwerk vor und analysieren ihre Umgebung indem sie extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose und Endozytose aufnehmen, diese prozessieren und als Peptide auf ihrer Oberfläche im MHC-Komplex präsentieren. Potenzielle antigene Bestandteile der Umgebung werden somit „sichtbar“ für  $\alpha\beta$ -T-Zellen gemacht, die erst durch Präsentation prozessierter Peptide im MHC-Komplex in der Lage sind, Antigene zu erkennen. Jeglicher Kontakt mit einem Gefahrensignal veranlasst die DCs, das Gewebe zu verlassen und in den drainierenden Lymphknoten auszuwandern. Dort interagieren sie in so genannten T-Zell-Arealen mit T-Zellen. In Abhängigkeit von ihrem Aktivierungsgrad sind sie in der Lage, entweder Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen zu induzieren oder eine spezifische T-Zell-Immunantwort zu initiieren. Die Induktion einer adaptiven Immunantwort wird erst dadurch erreicht, dass T-Zellen, die ihr spezifisches Antigen auf der DC im MHC-Komplex erkennen (Signal I), durch kostimulatorische Moleküle der DC aktiviert werden (Signal II).

Neben der Fähigkeit, die adaptive Immunantwort zu induzieren, sind DCs ferner in der Lage, unmittelbar auf einen pathogenen Stimulus durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zu reagieren. So tragen sie dazu bei, dass weitere Immunzellen zum Focus der Infektion rekrutiert und Effektorzellen der angeborenen Immunität aktiviert werden (Mellman and Steinman 2001).

Im humanen System lassen sich zumindest phänotypisch zwei verschiedene DC-Subpopulationen des peripheren Blutes unterscheiden. Die myeloide unreife CD11c<sup>+</sup> dendritische Zelle (MDC) und die CD11c<sup>−</sup> PDC (O'Doherty, Peng et al. 1994). Die zwei DC-Populationen exprimieren unterschiedliche Profile an PRRs, was zu der

Annahme geführt hat, dass sich diese DCs im Laufe der Evolution auf die Erkennung unterschiedlicher Pathogene spezialisiert haben (Shortman and Liu 2002).

#### 1.4.1. Plasmazytoide dendritische Zellen

1958 beschrieben Lennert und Remmele erstmals einen in den T-Zell-Regionen reichlich vorkommenden, sich den Plasmazellen ähnelnden Zelltyp, der aber nicht die klassischen B-Zell- oder Plasmazellmarker trug (Lennert and Remmele 1958). Diese Zellen wurden T-assoziierte Plasmazellen und später plasmazytoide T-Zellen genannt (Lennert and Remmele 1958; Facchetti, Vermi et al. 2003). Weil diese Zellen ebenfalls einige Marker mit myelomonozytären Zellen gemeinsam hatten, wurden sie auch plasmazytoide Monozyten genannt (Facchetti, Vermi et al. 2003). Diese verschiedenen Namen wurden jahrelang austauschbar für ein und dieselbe Zelle verwendet.

Humane periphere Leukozyten des Blutes sind dafür bekannt, nach Exposition von Viren Typ I IFN zu produzieren. 1978 konnten Trinchieri und Mitarbeiter zeigen, dass Typ I IFN ein starker Aktivator von NK-Zellen ist und dass die nach viraler Exposition beobachtete Typ I IFN-Sekretion nur auf eine kleine, einzelne Zellpopulation zurückzuführen ist (Trinchieri, Santoli et al. 1978). Diese Interferon-produzierenden Zellen waren weder T-, B- oder NK-Zellen noch Monozyten (Abb, Abb et al. 1983; Perussia, Fanning et al. 1985). Obwohl die Interferon-produzierenden Zellen sich als seltene, nicht-adhärenente *lineage*- MHC-II+ mononukleäre Zellen herausstellten, unterschieden sie sich klar von den klassischen peripheren DCs des Blutes (Chehimi, Starr et al. 1989; Feldman and Fitzgerald-Bocarsly 1990).

1994 identifizierten O'Doherty und Mitarbeiter in humanem Blut eine Population CD11– unreifer DCs mit geringer MHC-II-Expression und nur geringfügiger T-Zell-stimulatorischer Kapazität (O'Doherty, Peng et al. 1994). In Kultur mit Monozyten-konditioniertem Medium jedoch erhöhen diese Zellen ihre MHC-II-Expression und erlangen eine Morphologie ähnlich der von anderen DCs. Grouard und Mitarbeiter isolierten dann aus den Tonsillen eine CD11– CD4+ CD45RA+ Zelle, die den durch O'Doherty beschriebenen Zellen sowie den plasmazytoiden T-Zellen fast identisch waren (Grouard, Rissoan et al. 1997). Nach Isolation starben diese Zellen schnell in der Kultur, in Anwesenheit von IL-3 und CD40-Ligand jedoch differenzierten sie zu Zellen mit morphologischen Charakteristika reifer DCs (Grouard, Rissoan et al. 1997).

1999 identifizierten Siegal und Cella endgültig die plasmazytoiden dendritischen Zellen (*plasmacytoid dendritic cell*, PDCs) im peripheren Blut und sekundären Lymphorganen als identisch mit den Typ I IFN-produzierenden Zellen (Cella, Jarrossay et al. 1999; Siegal, Kadowaki et al. 1999). Der Phänotyp der PDCs ist CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> IL-3Ra(CD123)<sup>+</sup> CD11<sup>–</sup> *lineage*–. Zwei weitere Marker, *blood dendritic cell antigen* (BDCA)-2 und BDCA-4, sind für die PDCs des peripheren Blutes und des Knochenmarks spezifisch (Dzionek, Sohma et al. 2001). BDCA-2 ist ein transmembranes Glykoprotein, dass Antigen internalisieren und den T-Zellen präsentieren kann (Dzionek, Sohma et al. 2001). BDCA-4 ist dem Neuropilin-1 identisch. Neuropilin ist ein Korezeptor des vaskulären Wachstumsfaktors A auf endothelialen Tumorzellen. Weil Antikörper gegen BDCA-4 die Aktivität der PDCs nicht beeinflussen, wird dieser für die experimentelle Isolation dieser Zellpopulation herangezogen.

PDCs sind im unreifen Zustand äußerst ineffektive APCs. Vielmehr besteht ihre Aufgabe zunächst darin, durch die Sekretion regulatorischer Zytokine die Immunantwort zu modulieren. Typ I IFN spielt dabei eine zentrale Rolle. Das durch die PDCs sezernierte Typ I IFN aktiviert die zytolytische Aktivität von NK-Zellen, schützt aber die uninfizierten, gesunden Zellen vor der NK-vermittelten Zytolyse (Trinchieri, Santoli et al. 1978; Brawand, Fitzpatrick et al. 2002). Auch beeinflusst das Typ I IFN die T-Zell-Funktionen und führt zu einer Induktion von frühen Aktivierungsmarkern wie CD69, zu einem gesteigerten Langzeitüberleben der T-Zellen sowie zu einer T<sub>H</sub>1-Differenzierung (Agnello, Lankford et al. 2003). Des Weiteren führt das Typ I IFN der PDC zu einer gesteigerten Differenzierung und zur Aktivierung von DCs (Santini, Lapenta et al. 2000).

#### 1.4.2. Myeloide dendritische Zellen

DCs myeloiden Ursprungs (*myeloid dendritic cells*, MDCs) finden sich im humanen System als gewebständige Zellen in praktisch allen menschlichen Organen. Die meisten Einblicke in die Biologie dieser Zellen stammen jedoch nicht aus der Isolation dieser Zellen aus Gewebe, sondern aus *in vitro*-Kultur Studien. So lassen sich aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen, CD14<sup>+</sup> Monozyten oder aus CD11c<sup>+</sup> Vorläuferzellen des peripheren Blutes durch Kultur mit verschiedenen Zytokinzusätzen zu MDCs differenzieren und generieren (Romani, Gruner et al. 1994; Caux, Massacrier et al. 1997; Ito, Inaba et al. 1999). Während ihres unreifen Stadiums sind diese DCs äußerst

effizient in der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Durch Zugabe eines geeigneten Ausreifestimulus sind diese DCs ferner in der Lage, große Mengen an IL-12 zu produzieren, welches schließlich naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in IFN- $\gamma$ -produzierende T<sub>H</sub>1-Zellen polarisiert (Guernonprez, Valladeau et al. 2002). Die Möglichkeit, diese DCs in großen Mengen und in relativ kurzer Zeit *in vitro* zu generieren, machen sie zu einer interessanten therapeutischen Option als „natürliches Adjuvans“. MDCs werden daher zurzeit in zahlreichen klinischen Studien als zelluläres Impfadjuvans in verschiedenen Strategien der therapeutischen Vakzinierung gegen Tumoren eingesetzt (Fong and Engleman 2000).

#### 1.4.3. Monozyten

Monozyten stellen eine äußerst heterogene Zellpopulation des peripheren Blutes dar. Sie machen etwa 5-10% der Leukozyten aus und stellen sich morphologisch durch verschieden starke Granulierung und ungleiche Größe des Kerns und der Zelle selbst dar. Den unterschiedlichen Ausprägungen dieser Zellen ist gemeinsam, dass sie im Knochenmark aus einer mit den neutrophilen Granulozyten gemeinsamen Vorläuferzelle der myeloiden Entwicklungsreihe entstehen (van Furth and Cohn 1968). Monozyten müssen in einem ersten Ansatz selbst als Vorläuferzelle betrachtet werden, denn nach ihrer Entstehung im Knochenmark wandern sie zunächst aus diesem in das periphere Blut aus und nach etwa zehntägiger Zirkulation wieder in verschiedene Gewebe ein. Hier differenzieren sie sich durch unterschiedliche Aktivierung in gewebständige Makrophagen, Osteoklasten oder MDCs (van Furth and Cohn 1968). Allen diesen Zelltypen ist gemeinsam, dass eine ihrer Hauptfunktionen die phagozytotische Aufnahme von Mikropartikeln ist. Im Falle der DCs und den Makrophagen werden diese zusätzlich prozessiert und später auf MHC-II-Molekülen den Effektorzellen des Immunsystems präsentiert (van Furth and Cohn 1968).

Erste Differenzierungen der Monozyten bzw. Monozyten-artigen Vorläuferzellen zu primitiven Makrophagen beginnen bereits in der Embryonalperiode im Dottersack. Solche primitiven Makrophagen konnten anhand von morphologischen Kriterien sowie anhand der Expression von Makrophagenmarkern wie FMS, CD11b und Rezeptoren für Mannose identifiziert werden (Hume, Monkley et al. 1995; Hughes and Gordon 1998; Takahashi, Donovan et al. 1998). Experimente an Zebrafischen, in denen die Entwicklung der Hämatopoese durch die Transparenz der Embryos leichter verfolgt werden kann, haben darüber hinaus die Existenz von Monozyten-artigen

Makrophagen-Vorläuferzellen bestätigt (Herbomel, Thisse et al. 1999). Etwas später in der embryonalen Entwicklung wird die fetale Leber der wichtigste Ort für die Entstehung der Monozyten bis schließlich das (dem adulten Menschen entsprechende) Knochenmark die Entstehung dieser Zellen übernimmt (Lichanska and Hume 2000; Shepard and Zon 2000).

Dass Monozyten aus dem peripheren Blut auswandern und in den Geweben zu weiter entwickelten Zelltypen ausreifen, wurde bereits 1939 von Ebert and Florey beschrieben (Ebert 1939). Und obwohl es heute als akzeptiert gilt, dass Monozyten die Vorläuferzellen von Makrophagen und DCs darstellen, bleiben die Mechanismen, die zur Entwicklung und Differenzierung dieser Zellen *in vivo* führen, bis heute unverstanden. Durch molekularbiologische Methoden konnte in der letzten Zeit etwas Klarheit in das heterogene Erscheinungsbild dieser Zellpopulation gebracht werden. Monozyten wurden ursprünglich als CD14<sup>+</sup> CD16<sup>–</sup> CD3<sup>–</sup> Zellen beschrieben. CD14 stellt eine wichtige Komponente des Rezeptors für Lipopolysaccharide (TLR4) dar, CD16 ist Teil des Rezeptors für Fc $\gamma$ -Fragmente von löslichen Antikörpern (Perussia, Fanning et al. 1983; Perussia, Trinchieri et al. 1984; Lanier, Ruitenberg et al. 1988). Eine genauere Analyse dieser Zellpopulationen durch Passlick und Fleiger hat jedoch ergeben, dass sich neben der klassischen CD14<sup>+</sup> CD16<sup>–</sup> Monozytenfraktion eine weitere, CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> Population charakterisieren lässt, die bis zu 15% der Gesamtmonozytenzahl ausmachen kann (Passlick, Flieger et al. 1989). Während Ziegler-Heitbrock et al. zeigen konnten, dass diese Subfraktion der Monozyten starke Charakteristika von reifen, gewebsständigen Makrophagen aufweisen, zeigten Weber et al. darüber hinaus, dass die zwei Monozytenfraktionen über ein unterschiedliches Kontingent an Chemokinrezeptoren (CCRs) verfügen (Ziegler-Heitbrock, Fingerle et al. 1993; Weber, Belge et al. 2000).

Beide Monozytenfraktionen differenzieren durch Kulturbedingungen mit GM-CSF und IL-4 zu DCs aus (Sallusto and Lanzavecchia 1994; Sanchez-Torres, Garcia-Romo et al. 2001). Randolph und Beaulieu konnten 1998 unter Verwendung eines transendothelialen Migrationsmodells *in vitro* zeigen, dass Monozyten über eine endotheliale Membran migrierten, zu Makrophagen differenzierten und in der subendothelialen Matrix verblieben. Alternativ differenzierten sie zu DCs aus, welche dann über die endotheliale Membran zurück migrierten. In diesem Modell wurden CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> Monozyten eher zu DCs differenziert als CD16<sup>–</sup> Monozyten und migrierten somit häufiger zurück über die endotheliale Membran (Randolph, Beaulieu et al. 1998). Dies könnte zu der Annahme führen, dass diese Monozytenfraktion den

Vorläufer der DCs darstellt und aus Geweben zurück in die Blutbahn migriert oder über afferente Lymphbahnen Lymphknoten erreichen kann. Ob dies jedoch tatsächlich *in vivo* der Fall ist, bleibt zu diesem Zeitpunkt Spekulation.

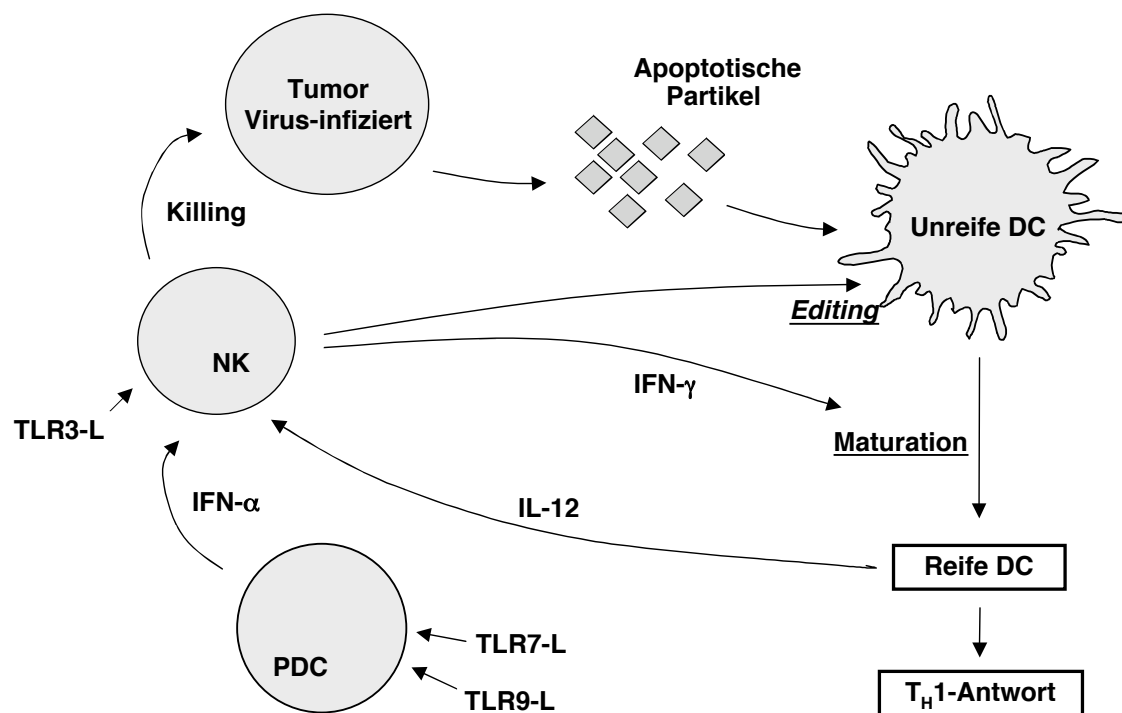
Die etablierteste Funktion des Monozyten, neben der Regeneration der gewebständigen Makrophagen und der Differenzierung zu Osteoklasten, ist die Fähigkeit, auf inflammatorische Prozesse in den verschiedenen Geweben zu reagieren, in diese Gewebe auszuwandern und dort in Makrophagen zu differenzieren (Van Furth, Diesselhoff-den Dulk et al. 1973). Solche „inflammatorischen Monozyten“ sind generell als Ly6C+ und CCR2+ charakterisiert und können auf verschiedenen Wegen *in vitro* aktiviert werden, wobei die Art der Aktivierung über die Antwort des Monozyten entscheidet (Van Furth, Diesselhoff-den Dulk et al. 1973). Werden inflammatorische Monozyten zum Beispiel durch INF- $\gamma$  oder LPS aktiviert, erhöhen sie ihre bakterizide Aktivität und produzieren vermehrt reaktive Sauerstoffderivate. Durch die Kultur mit IL-4, IL-10, IL-13 oder TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) wird ein Phänotyp generiert, der vor allem die Wundheilung antreibt und die Entzündungsreaktion unterdrückt (Goerdts and Orfanos 1999; Gordon 2003; Mosser 2003; Taylor, Martinez-Pomares et al. 2005).

#### 1.4.4. Crosstalk zwischen dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion

NK-Zellen leisten ihren entscheidenden Beitrag zu einer adäquaten Immunreaktion auf zwei Wegen. Zum einen sind sie als Effektorzellen zusammen mit CTLs letztlich für die Elimination von solchen Zellen verantwortlich, die für den Organismus ein Gefahrenpotenzial beherbergen. Die Mechanismen, welcher sich die NK-Zellen für diese Aufgabe bedienen, wurden bereits ausführlich besprochen. Die Forschung insbesondere der letzten Jahre hat darüber hinaus neben den genannten Effektorfunktionen auch eine entscheidende regulatorische Rolle für diese Zellpopulation identifizieren können (Moretta 2005; Moretta, Marcenaro et al. 2005). NK-Zellen interagieren im Rahmen einer Immunreaktion mit anderen Zellen und modulieren auf diese Weise die folgende Immunantwort. Dies scheint besonders in der frühen Phase einer Entzündung der Fall zu sein, wobei Infektionen durch mikrobakterielle Pathogene und maligne Zellveränderungen hier gleichermaßen gemeint sind.

Eine besondere Stellung bei der Immunmodulation durch die NK-Zelle nimmt die Interaktion mit DCs ein, der so genannte *NK-DC-Crosstalk*. Fernandez und Mitarbeiter zeigten 1999 in einer Arbeit im murinen System erstmals, dass NK-Zell-vermittelte Antitumor-Effekte *in vivo* durch DCs verstärkt werden können (Fernandez, Lozier et al. 1999). Auf diese Arbeit folgten mehrere Publikationen, welche diese Beobachtungen näher charakterisierten und die modulierende Interaktion der NK-Zellen mit weiteren Zellpopulationen – neben MDCs auch PDCs, Eosinophile und Mastzellen – identifizierten (Moretta 2005). Interessant und wichtig ist, dass die Interaktion der NK-Zellen mit dem jeweiligen Interaktionspartner Zelltyp-spezifisch die Immunreaktion modulieren kann. Es scheint, als führe der *Crosstalk* zwischen NK-Zellen und Eosinophilen oder Mastzellen eher zu einer  $T_H2$ -gerichteten, der Kontakt mit APCs hingegen zu einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort. Die Abbildung 3 liefert eine schematische Aufstellung über die Rolle der NK-Zellen im Sinne des *Crosstalks* mit dem Resultat einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort.





**Abb. 3** *Crosstalk zwischen NK-Zellen und dendritischen Zellen in der frühen Phase einer Immunreaktion*

NK-Zellen vermögen es, Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen ohne vorhergehende Sensibilisierung zu lysieren. Dieses stellt die früheste Phase der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Pathogen dar. Die Lyse durch die NK-Zellen kommt zum großen Teil durch eine Minderexpression von MHC-I-Molekülen der geschädigten Zellen zustande (Long 1999). Durch dieses „natürliche“ Killing werden apoptotische Partikel freigesetzt, welche von unreifen APCs aufgenommen werden und auf diese Weise zu deren Ausreifung führen. Die Sekretion von IFN- $\gamma$  durch aktivierte NK-Zellen unterstützt zusätzlich die Maturation von DCs, welche jetzt verschiedene Oberflächenmoleküle aufreguliert (MHC-I, CD80, CD83, CD86, CCR7) und selbst Zytokine sezerniert. Die Sekretion von IL-12 und TNF- $\alpha$  durch die reife DC unterstützt weiter die Aktivität der NK-Zellen. Im reifen Stadium kann die DC prozessierte antigene Strukturen via MHC-I-Molekülen präsentieren und eine CD8-T-Zell-gerichtete T<sub>H</sub>1-Antwort in Gang setzen (Moretta, Marcenaro et al. 2005). Die PDCs können nach erfolgreicher Stimulation durch TLR7- und TLR9-Liganden durch die Sekretion von IFN- $\alpha$  ebenfalls regulatorisch die Immunantwort beeinflussen. IFN- $\alpha$  steigert insbesondere die Zytotoxizität der NK-Zellen, nicht jedoch die IFN- $\gamma$ -Produktion. Die Persistenz von unreifen DCs und die Entstehung von Zwischenstufen nicht voll ausgereifter DCs stellen für das Gelingen der Immunreaktion ein Risiko dar. Diese Zellen können kein Antigen präsentieren oder präsentieren dieses schwach (ohne kostimulatorische Moleküle) und können im schlimmsten Fall Anergie der CD8-T-Zellen gegenüber dem (gefährlichen) Pathogen induzieren. NK-Zellen kontrollieren diese Gefahr, indem sie zytotoxische Aktivität gegenüber unreifen DCs und nicht voll ausgereiften DCs entwickeln (NK-Zell-vermitteltes DC-Editing). Autologe Zytotoxizität durch NK-Zellen wird über den aktivierenden NK-Zell-Rezeptor NKp30 vermittelt und besteht selbst dann, wenn DCs bereits eine beträchtliche Menge von MHC-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche exprimieren. (Ferlazzo, Tsang et al. 2002).

## 1.5. Nukleotidsequenzen als Adjuvans in der Immuntherapie

### 1.5.1. Die Erkennung von Ribonukleotiden als Abwehrmechanismus

Wingard hatte bereits 1928 eine Immunreaktion der Tabakpflanze gegen das Tabak-Ringel-Virus beobachtet (Wingard 1928). Heute wissen wir, dass diese Immunreaktion auf das Phänomen der RNA Interferenz zurückzuführen war. Im Gegensatz zu Pflanzen, die beinahe ausschließlich RNA Interferenz zur Detektion und Elimination von Viren verwenden, haben höhere Vertebraten hierzu zusätzliche Mechanismen entwickelt, die es dem Organismus erlauben, immunologisch zwischen fremden und eigenen Strukturen zu unterscheiden. Dies ist Voraussetzung für das Fortbestehen des Lebens, denn während fremde Strukturen ständig den Organismus bedrohen und durch das Immunsystem angegriffen werden, müssen die eigenen Strukturen unbedingt geschont werden. So kann unser Immunsystem zum Beispiel besondere Basenmuster und die Ausprägung der Methylierung innerhalb von bakterieller DNA erkennen, die dann als Gefahrensignale gewertet werden und zu einer Immunreaktion führen (Krieg 2002). Neben Bakterien stellen auch Viren und zahlreiche weitere Organismen eine ständige Bedrohung für den Menschen dar. Es ist daher nicht überraschend, dass es zusätzlich zur Erkennung von bakterieller DNA weitere Mechanismen innerhalb des Immunsystems gibt, die konsequent virale Strukturen als Gefahrensignale erkennen und zu einer adäquaten Immunreaktion führen.

Eine wichtige Erkenntnis bei der Erkennung von viralen Strukturen durch das Immunsystem ist, dass lange dsRNA in eukaryontischen Zellen unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommt, jedoch von den meisten Viren während deren Replikationszyklus im Zytosol gebildet wird. Dieses erlaubt es der eukaryonten Zelle, lange dsRNA als Virus-assoziiertes Gefahrenpotenzial zu erkennen (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). Wird ein solches Virus-assoziiertes Gefahrenpotenzial vom Immunsystem erkannt, kommt es zu einer Immunreaktion und zu einer Elimination oder Stummschaltung der viralen RNA. Wie weiter oben beschrieben wurde, kann darüber hinaus neben langer dsRNA auch lange ssRNA und kurze dsRNA vom Immunsystem erkannt werden und eine Immunreaktion hervorrufen (Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005; Sioud 2005). Da diese RNA Formen jedoch zusätzlich auch unter physiologischen Bedingungen bei der Regulation der Genexpression in eukaryonten Zellen vorkommen, werden vom Immunsystem zusätzlich Mechanismen zur Unterscheidung zwischen *Selbst* und *Fremd* benötigt.

Die Unterscheidung zwischen *Selbst* und *Fremd* wird bei der Erkennung kurzer dsRNA auf die Sequenz-Spezifität dieser kurzen Moleküle zurückgeführt und über TLRs vermittelt (Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005; Judge, Sood et al. 2005). Diese Sequenz-Spezifität ist für ssRNA, wie zum Beispiel mRNA, weit weniger ausgeprägt (Scheel, Teufel et al. 2005). Kariko und Mitarbeiter konnten 2005 zeigen, dass humane mitochondriale RNA in monozytären DCs eine ähnlich hohe TNF- $\alpha$ -Induktion hervorrief wie RNA isoliert von *Escherichia coli* (Kariko, Buckstein et al. 2005). Weil keine RNA aus anderen Kompartimenten unter diesen Bedingungen eine Immunreaktion verursachte, vermutete die Arbeitsgruppe, dass die RNA höherer Säuger durch natürlich vorkommende Nukleosid-Modifikationen maskiert seien. In Experimenten zeigte die Arbeitsgruppe, dass die Modifikation der mitochondrialen RNA durch Austausch mit modifizierten Nukleosiden wie Pseudouridin, Inosin oder verschiedene Methylierungen der Basen zu einem Verlust der immunstimulatorischen Effekte führte.

### 1.5.2. Wirkung auf das Immunsystem

#### 1.5.2.1. Wirkung von Ribonukleotiden auf subzellulärer Ebene

Die Mechanismen, die das Immunsystem höherer Organismen zur Detektion viraler Nukleinsäuren verwendet, sind größtenteils unverstanden und daher Gegenstand aktuellster Forschung. Lange Zeit wurden lediglich zwei Gene für die Erkennung langer dsRNA verantwortlich gemacht: 1) Die 2',5-Oligoadenylat-Synthase führt zu einer Sequenz-unabhängigen Degradation der RNA durch die RNase L (Minks, West et al. 1979). 2) Aktivierte Proteinkinase R (PKR) phosphoryliert den eukaryontischen Translationsfaktor EIF2A und hemmt so die Translation. Es wurde zunächst angenommen, dass die Aktivierung der PKR auch zur Induktion des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B führe, Typ I IFN induziere und somit der wichtigste Erkennungsmechanismus für virale dsRNA als Gefahrensignale sei (Lampson, Tytell et al. 1967; Kumar, Haque et al. 1994).

Anfang der 90er Jahre beobachteten jedoch einige Forschungsgruppen unabhängig voneinander, dass PKR-defiziente Zellen, die mit dsRNA stimuliert wurden, weiterhin Typ I IFN produzieren konnten (Chu, Ostertag et al. 1999; Maggi Jr. 2000). Die Forschungsgruppe um Alexopoulou konnte bald darauf durch Experimente mit dem Doppelstrang-RNA-Mimik Poly(I:C) und murinen TLR3-defizienten Zellen zeigen, dass durch dsRNA über die Bindung an TLR3 die Aktivierung erfolgte und über eine TRIF-vermittelte Signaltransduktion NF- $\kappa$ B und Typ I IFN induziert wurde (Alexopoulou,

Holt et al. 2001). Arbeiten von Fitzgerald und Doyle charakterisierten darüber hinaus 2002 bzw. 2003 weitere Komponenten der Signaltransduktionskaskade. Sie konnten zeigen, dass die Typ I IFN Antwort unter anderem durch die Aktivierung der Kinase TBK1, welche wiederum den Transkriptionsfaktor IRF3 phosphoryliert, zustande kommt (Doyle, Vaidya et al. 2002; Fitzgerald, Rowe et al. 2003). TLR3 ist sowohl an der Zelloberfläche als auch in endosomalen Kompartimenten lokalisiert, nicht jedoch im Zytosol.

Experimente an *Knockout*-Mäusen für TLR3 zeigten jedoch bald, dass sich zusätzlich eine Typ I IFN Immunantwort durch dsRNA erzeugen ließ, die weder auf PKR noch auf TLR3 zurückzuführen waren (Diebold, Montoya et al. 2003). Yoneyama und Mitarbeiter machten 2004 durch entsprechende Experimente im Zytosol von verschiedenen Zellen den so genannten RIG-I Proteinkomplex für diese Beobachtungen verantwortlich (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). Dieser Proteinkomplex besteht aus einer N-terminalen Caspase-Rekrutierungsdomäne (CARD), verantwortlich für das *downstream*-Signal, und einer C-terminalen DexD/H Helikase-Domäne zur Erkennung dsRNA. Zunächst war unklar, welche Eigenschaften eine RNA aufweisen musste, um von RIG-I erkannt zu werden und ob dies ähnliche Eigenschaften waren wie zum Beispiel für die Erkennung durch TLR3. Neusten Ergebnissen zufolge ist eine 5'-Triphosphat-Modifizierung von RNAs, wie sie bei der *in vitro*-Transkription von RNA entstehen kann, ein möglicher Ligand für RIG-I (Hornung, Ellegast et al. 2006). Kato und Mitarbeiter haben darüber hinaus mit der Identifizierung von Mda5 eine weitere Helikase zur Identifizierung viraler RNA charakterisiert (Kato, Takeuchi et al. 2006).

In Untersuchungen zur Infektion mit dem Influenzavirus fielen Diebold und Mitarbeitern 2004 auf, dass aus dem Genom dieser Viren prozessierte ssRNA-Moleküle über TLR7 und TLR8 erkannt wurden und zu einer Aktivierung der PDCs führten (Diebold, Kaisho et al. 2004). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Erkennung über die genannten Rezeptoren abhängig von der Lokalisation der RNA im endosomalen Kompartiment war. Der beschriebene Mechanismus galt für das murine System. Heil und Mitarbeiter konnten zeitgleich darlegen, dass die Erkennung von ssRNA im humanen System ebenfalls über TLR7 und TLR8 erfolgen kann (Diebold, Kaisho et al. 2004; Heil, Hemmi et al. 2004). Sie konnten zusätzlich erste Aussagen über die Beschaffenheit von RNA-Molekülen treffen, welche zu einer Immunstimulation geführt hatten. Eine tatsächliche Motiv-Spezifität konnte jedoch erst durch Hornung für die Erkennung dsRNA identifiziert werden (Hornung, Guenther-Biller et al. 2005).

Die oben aufgeführten Ergebnisse der Arbeiten lassen folgendes Erklärungsmodell für die Erkennung viraler Nukleinsäuren durch das Immunsystem zu: TLR3 ist sowohl an der Zelloberfläche und in endosomalen Kompartimenten lokalisiert und erkennt dsRNA. Der Signaltransduktionsweg ist weiter oben bereits beschrieben. Im Zytosol vorliegende dsRNA wird durch Mda5 und RIG-I Sequenz-unabhängig erkannt, RIG-I erkennt dsRNA solange diese an den 5'-Enden eine Triphosphatgruppe trägt. Die Erkennung von kurzer dsRNA sowie die Erkennung von langer ssRNA und kurzer ssRNA werden durch die im endosomalen Kompartiment vorliegenden TLR7 und TLR8 erkannt. Bei der Erkennung über TLR7 und TLR8 besteht eine Sequenz-Abhängigkeit ausschließlich für die kurzen Moleküle.

#### 1.5.2.2. Wirkung von Ribonukleotiden auf zellulärer Ebene

Nicht-Immunzellen: Die Erkennungsmechanismen für RNA sind in den verschiedenen Zellen des Organismus unterschiedlich verteilt. Melchjorsen und Mitarbeiter zeigten 2005, dass die Induktion einer Abwehrreaktion nach Infektion mit Paramyxoviren in Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten gänzlich von RIG-I abhängig war (Melchjorsen, Jensen et al. 2005). Im Gegensatz dazu war die Erkennung durch Immunzellen (myeloide Zellen) der gleichen Viren überwiegend TLR7- und TLR8-abhängig und weitestgehend unabhängig von RIG-I, Mda5 und PKR. Kato und Mitarbeiter konnten die Aussage der Zelltyp-Spezifität kurze Zeit später durch eigene Experimente reproduzieren und zusätzlich zeigen, dass PDCs nach Infektion mit Paramyxoviren RIG-I unabhängig IFN- $\alpha$  induzierten (Kato, Sato et al. 2005). Die Arbeitsgruppe um Matsumoto zeigte darüber hinaus, dass TLR3 in Fibroblasten auf der Oberfläche der Zellen, in Immunzellen jedoch im endosomalen Kompartiment, lokalisiert ist (Matsumoto, Funami et al. 2003).

PDCs: Im Gegensatz zu Nicht-Immunzellen exprimieren mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (immunkompetente Zellen) eine Reihe von TLRs, wobei verschiedene Subpopulationen verschiedene Muster dieser Rezeptoren tragen (das gesamte Verteilungsmuster ist weiter oben beschrieben). Die PDC trägt TLR7 und TLR9 im endosomalen Kompartiment und kann daher durch Stimulation mit immunstimulatorischen CpG-ODN bzw. RNA große Mengen an IFN- $\alpha$  produzieren (Krieg 2002; Hornung, Guenther-Biller et al. 2005). Auf die Besonderheit der Aktivierung von IRF7 bei der Signaltransduktion in PDCs nach Stimulation von TLR7

und TLR9 wurde bereits hingewiesen. Die Aktivierung ist entscheidend für die Fähigkeit der PDCs, IFN- $\alpha$  in großen Mengen zu produzieren.

Um von der Zelle aufgenommen zu werden und in das endosomale Kompartiment zu gelangen, müssen die bei artifizieller Stimulation verwendeten Moleküle an Trägermoleküle gebunden sein. Hierzu eignen sich unter anderem kationische Lipide, polykationische Peptide und methylierte Ammoniumsulfat-Verbindungen (Diebold, Kaisho et al. 2004; Heil, Hemmi et al. 2004).

Monozyten und MDCs: Monozyten exprimieren von denen zur Erkennung von Nukleinsäure befähigten TLRs lediglich TLR8, jedoch kein TLR3, TLR7 und TLR9 (Hornung, Rothenfusser et al. 2002). Die aus Monozyten entstehenden MDCs exprimieren zusätzlich TLR3 und vermögen es so, lange dsRNA zu erkennen. TLR3 befindet sich – im Gegensatz zu den Nicht-Immunzellen – im endosomalen Kompartiment (Matsumoto, Funami et al. 2003). Eine bereits zitierte Arbeit von Hornung et al. zeigte darüber hinaus, dass Monozyten vermittelt über RIG-I *in vitro*-transkribierte RNA mit 5'-Triphosphat-Ende im Zytosol erkennen und eine Typ I IFN Antwort induzieren.

NK-Zellen: NK-Zellen erkennen lange dsRNA über TLR3 (Alexopoulou, Holt et al. 2001). Eine mögliche Lokalisation von TLR3 auch auf der Zelloberfläche von NK-Zellen wird diskutiert (Hart, Athie-Morales et al. 2005). Darüber, inwieweit NK-Zellen über weitere TLRs zur Erkennung von Nukleinsäuren verfügen, herrschen im Forschungsfeld verschiedene Meinungen. Die Gruppe um Moretta beschreibt zum Beispiel eine funktionelle Aktivität für TLR9 in NK Zellen und eine entsprechende Liganden-induzierte Zytokinantwort hervorgerufen durch CpG-ODN (Sivori, Falco et al. 2004; Sivori, Carlomagno et al. 2006). Eine andere Arbeitsgruppe sah in ihren Experimenten mRNA für TLR7 und TLR8 in NK-Zellen und eine Aktivierung dieser Zelle durch den Liganden R848 (Hart, Athie-Morales et al. 2005). R848 stimuliert TLR7 und TLR8. In einer Arbeit aus dem eigenen Labor zeigten Hornung und Kollegen 2002, dass NK-Zellen keine weiteren mRNA für TLRs neben TLR3 besitzen (Hornung, Rothenfusser et al. 2002). Diese Ergebnisse wurden unter anderem durch Gorski und Mitarbeiter reproduziert (Gorski, Waller et al. 2006). Darüber hinaus deckt sich diese Aussage mit den Ergebnissen zahlreicher Publikationen, die unter Verwendung geeigneter TLR-Liganden und vor allem suffizienten Aufreinigungsmethoden für die NK-Zellisolation keine direkte Aktivierung dieser Zellpopulation beobachteten (Gorski, Waller et al. 2006). Vielmehr verdichtet sich die Annahme, dass Liganden für TLR7 oder TLR8 (Guanosinanaloga oder Nukleinsäuren) oder für TLR9 (CpG-ODN) auf

anderen immunkompetenten Zellen NK-Zellen indirekt über die Induktion proinflammatorischer Zytokine und Zell-Zellkontakt aktivieren.

### 1.5.3. Die Verwendung von Oligoribonukleotiden als Therapeutika

Berichte über den heilsamen Effekt bakterieller Infektionen auf den Ausgang maligner Erkrankungen reichen bis in das 17. Jahrhundert zurück. Ende des 19. Jahrhunderts versuchten mehrere Ärzte, sich diesen Effekt gezielt zu Nutze zu machen, indem sie Patienten gezielt mit Bakterien oder Bakterienbestandteilen inokulierten. Pionier auf diesem Gebiet war der New Yorker Chirurg William Coley. Er versuchte, Patienten mit inoperablen Sarkomen mit bakteriellen Lysaten zu behandeln. Durch intratumorale Injektion von Lysaten aus *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* konnte er erstaunliche Heilungsraten von über 10 % erreichen.

Wie wir heute wissen, ist die Beobachtung, die Coley vor fast 100 Jahren gemacht hatte, zum Teil auf die immunstimulatorische Wirkung von bakterieller DNA zurückzuführen. Bakterielle DNA unterscheidet sich von der DNA höherer Organismen durch ihren Methylierungsgrad sowie durch die Frequenz von sogenannten CpG-Motiven. Wird bakterielle DNA über die erwähnten Charakteristika vom Immunsystem erkannt, kommt es zu einer starken Immunreaktion, die antitumoröse Effekte haben kann. Die Erkennung dieser CpG-Motive erfolgt über die Aktivierung von TLR9. TLR9 ist auf PDCs und auf B-Zellen lokalisiert. Nukleinsäure-basierte Medikamente, denen der beschriebene Wirkmechanismus zugrunde liegt, werden derzeit in klinischen Studien der Phase III zur erweiterten Therapie des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms getestet. Zahlreiche Studien und Experimente der Vergangenheit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* geben darüber hinaus Anlass zur Hoffnung, dass über die Behandlung von malignen Tumorerkrankungen hinaus eine Reihe weiterer Erkrankungen durch diese neuartige Medikamentenklasse behandelt werden können. Dazu zählen Asthma und Allergien, chronische Infektionen der verschiedensten Erreger genauso wie Autoimmunerkrankungen. (Chaung 2006; El Andaloussi, Sonabend et al. 2006; Krieg 2006; Scheel, Aulwurm et al. 2006; Wilson, Dar et al. 2006).

#### 1.5.4. Immunstimulatorische RNA als Therapeutika der Zukunft

CpG-ODNs und potenzielle weitere immunstimulatorische Nukleinsäuren wie die hier aufgeführte isRNAs stellen aus mehreren Gründen ein attraktives Immunstimulans für den klinischen Einsatz dar:

1. Nukleinsäuren als TLR-Rezeptorliganden führen im Gegensatz zu einzelnen Zytokinen wie etwa IFN- $\alpha$  oder IL-2 durch ihren Wirkungsmechanismus zu einer koordinierten Immunreaktion, die der natürlichen Situation näher kommt.
2. Die selektive Aktivierung professioneller APCs und die damit verbundene Förderung einer Antikörperproduktion und zellulären Immunantwort machen immunstimulatorische Nukleinsäuren zu einem geeigneten Adjuvans sowohl bei prophylaktischen als auch bei therapeutischen Impfungen.
3. Die Induktion einer T<sub>H</sub>1-Antwort mit Produktion von IFN- $\gamma$  wehrt Infektionen mit intrazellulären Erregern ab und wirkt allergischen Reaktionen entgegen, die auf dem *Switch* einer T<sub>H</sub>1- zu einer T<sub>H</sub>2-gerichteten Immunlage basieren.
4. Die TLR-vermittelte Stimulation des angeborenen Immunsystems und die T<sub>H</sub>1-Immunlage unterstützen die immunologische Abwehr von Tumorzellen.

Die Applikation von möglichen RNA-Therapeutika stellt eine Herausforderung dar, denn jegliche ungeschützte RNA wird in Geweben und Zellen schnell durch RNasen abgebaut. Richtungsweisende Erkenntnisse bezüglich potenzieller Applikationsformen lieferte die Arbeit der Forscher Scheel und Mitarbeiter von 2006. Die Arbeitsgruppe injizierte intratumoral nackte sowie Protamin-geschützte mRNA in Tumoren der Maus-Glioma-Zelllinie SMA-560 in syngen VM/Dk Mäusen (Scheel, Aulwurm et al. 2006). Sie fanden eine Tumorregression sowie eine Langzeit-Tumorimmunität bei diesen Mäusen. Biopsien der verbliebenen Resttumoren zeigten Charakteristika einer Immunreaktion (wie zum Beispiel eine CD8-T-Zell Infiltration). Die Protamin-geschützte mRNA hatte eine stärkere antitumoröse Wirkung als nackte mRNA und die Forscher vermuteten, dass dies auf eine verlängerte Halbwertszeit der Protamin-geschützten mRNA zurückzuführen sei. Soutschek und Mitarbeiter konnten in einer Arbeit zeigen, dass die Eigenschaft von siRNAs zur Stummschaltung des Gens für Apolipoprotein B (apoB) durch Einfügen partieller Phosphothioat-Bindungen, Methylierungen an 2'-O sowie eines Cholesterols am 3'-Ende des *sense*-Stranges über einen Pyrrolidin-Linker nicht beeinflusst wird (Soutschek, Akinc et al. 2004). Gleichzeitig führten die genannten chemischen Modifikationen zu günstigeren pharmakinetischen Eigenschaften und



ermöglichten die *in vivo* Anwendung bei Mäusen. Es ist anzunehmen, dass Gleiches auch für die Verwendung von isRNA gilt.

Die Ausführungen zeigen, dass eine neuartige Medikamentenklasse basierend auf isRNA einen zukunftssträchtigen Ansatz zur Behandlung verschiedenster Pathologien darstellt. Darüber hinaus könnte man sich vorstellen, innerhalb dieser neuen Medikamentenklasse solche Moleküle zu erzeugen, die zum einen selektiv ein oder mehrere Gene über RNA Interferenz ausschalten und auf der anderen Seite zu einer spezifischen Immunreaktion führen (Schlee, Hornung et al. 2006).

#### 1.5.5. Alternative Immunstimulation von Natürlichen Killerzellen und anderen Effektorzellen

Eine Vielzahl von Experimenten und Studien sind mit der Absicht durchgeführt worden, das antitumorale Potenzial von NK-Zellen zu untersuchen und zu verstärken um so neue Therapiestrategien für die Behandlung von malignen Erkrankungen zu generieren. Die Grundlage solcher Therapien soll im Prinzip zwei verschiedene Ansätze beinhalten – zum einen die endogene Aktivierung von NK-Zellen des Patienten durch die lokale oder systemische Applikation von Zytokinen (Maraninchi, Vey et al. 1998; Chang and Rosenberg 2001; Mulatero, Penson et al. 2001). Zum anderen soll durch die *ex vivo* Anreicherung und Aktivierung und die anschließende Re-Infusion autologer oder allogener NK-Zellen dessen antitumorale Aktivität genutzt werden (Rosenberg, Lotze et al. 1993; Hayes, Koslow et al. 1995). Gewisse Erfolge konnten durch diese Therapiestrategien für die Behandlung von Patienten mit Nierenzellkarzinom und malignem Melanom sowie für das Bronchialkarzinom und gewisse Lebertumore beschrieben werden (Rosenberg, Lotze et al. 1993; Semino, Martini et al. 1999; Margolin and Forman 2000; Margolin 2000).

Als NK-Zell-aktivierendes und -expandierendes Zytokin *in vivo* als auch *ex vivo* wird in vielen dieser Ansätze IL-2 verwendet. Neuere Aufreinigungsverfahren und bessere Kulturbedingungen *ex vivo* konnten weitere Fortschritte für diesen Behandlungsansatz erzeugen. Eine im Jahre 2000 veröffentlichte Studie bestätigte einen positiven Effekt von IL-2 und GM-CSF angereicherten NK-Zellen bei der Behandlung einiger fortgeschrittener Stadien von Brustkrebs (Burns, Weisdorf et al. 2000). Weitere Versuche jedoch, die hohe Toxizität der Therapien mit IL-2 durch die Kombination mit anderen Zytokinen zu vermindern, lieferten durchweg enttäuschende Ergebnisse und haben diesen Therapieansatz in den vergangenen Jahren immer

weiter in den Hintergrund gedrängt. Ähnliches trifft für Therapieversuche mit IL-12 zu (Brunda, Luistro et al. 1993; Brunda and Gately 1995; Noguchi, Jungbluth et al. 1996; Nanni, Nicoletti et al. 2001; Colombo and Trinchieri 2002).

Eine Ausnahme bildet eventuell die Behandlung des Hodgkin-Lymphoms. Für die Verwendung von IL-2 in Kombination mit bispezifischen Antikörpern gegen den Hodgkin-assoziierten Marker CD30 und den NK-Zell-Marker CD16 konnte eine NK-Zell-vermittelte Destruktion von Hodgkinzellen nachgewiesen werden (da Costa, Renner et al. 2000; Renner, Hartmann et al. 2000). Ob sich diese vereinzelter Beobachtungen jedoch in umfangreicheren Studien bestätigen lassen und ob sich daraus eine klinische Anwendung erarbeiten lässt, bleibt zu diesem Zeitpunkt völlig ungewiss.

Ein weiterer Ansatz, der ohne die Verwendung von IL-2 auskommt, ist die Applikation der NK-Zelllinie NK-92 (Gong, Maki et al. 1994). Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus einem Patienten mit granulärem Lymphom isoliert und weist Charakteristika der aktivierten NK-Zelle auf. NK-92 exprimiert weder FcR noch KIRs, besitzt eine *in vitro* Toxizität gegenüber den verschiedensten Tumorzellen aber erstaunlicherweise nicht gegenüber gesunden humanen Zellen. Diese Zelllinie könnte systemisch oder lokal appliziert werden und so ihre antitumorale Wirkung entfalten. Behandlungsstrategien unter der Verwendung der Zelllinie NK-92 befinden sich momentan in der klinischen Erprobung (Arai, Meagher et al. 2008).

## 1.6. Fragestellung

Das Immunsystem hat im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, um in den Organismus eindringende Nukleinsäuren anderer Spezies als Gefahrensignal zu identifizieren und zu eliminieren. Bakterielle DNA enthält so genannte CpG-Motive und weist einen verminderten Methylierungsgrad auf als humane DNA. Solche Gefahrensignale werden über den Erkennungsrezeptor TLR9 erkannt und führen zu einer Immunreaktion, die über PDCs und B-Zellen vermittelt wird. Medikamente, dessen Wirkmechanismen auf diesem Prinzip basieren, sind in fortgeschrittenen Stadien der klinischen Erprobung gescheitert. Als Grund wird hierfür die Unfähigkeit von TLR9-Agonisten angesehen, im humanen System das für eine  $T_H1$ -gerichtete Immunantwort essentielle IL-12 zu induzieren.

Die Mechanismen, die zur Erkennung von fremder RNA führen, werden seit langem untersucht, sind aber zum größten Teil noch unverstanden. Unserer Arbeitsgruppe gelang es 2005 in diesem Zusammenhang zu zeigen, dass bestimmte, kurzkettige RNAs, die zur Induktion des Phänomens der RNA Interferenz verwendet werden, eine spezifische Immunreaktion hervorrufen können. Die einfache Handhabung und das flexible Design von siRNA lassen hoffen, dass diese Molekülklasse in der nahen Zukunft in der klinischen Anwendung überzeugen wird.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die immunstimulatorische Komponente von RNA auf Effektorzellen des humanen Immunsystems zu charakterisieren. Gegenstand der Arbeit war es daher, zunächst zu überprüfen, ob Effektorzellen des humanen Immunsystems prinzipiell durch siRNAs aktiviert werden können. Besonderes Augenmerk sollte auf eine mögliche Induktion einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort gelegt werden, da diese Voraussetzung für eine effektive Immunreaktion gegen Tumorzellen und viral befallenen Zellen ist. Ferner sollten in diesem Zusammenhang die möglichen Mechanismen skizziert werden, die bei der Aktivierung ausschlaggebend sind.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Reagenzien, Chemikalien und Geräte

#### 2.1.1. Geräte

Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
FACStarplus	Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Gene Quant RNA/ DNA Calculator	Fa. Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Hamilton Spritze	Fa. Hamilton Co. (Reno, Nevada, USA)
Kamera Nikon F90X	Fa. Nikon GmbH (Düsseldorf, D)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Light Cycler	Fa. Roche (Mannheim, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Photokammer	Fa. Kodak (Rochester, NY, USA)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, D)
Scintillation Counter	Fa. Biorad (München, D)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40	Fa. Stratagene (Heidelberg, D)
Vortex VF2	Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage (SBC 21)	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
Zentrifuge (5417 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

#### 2.1.2. Chemikalien

Brefeldin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Geneticin g-418 Sulfat	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D)
To-Pro-3-Iodid (TOPRO-3)	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

## 2.1.3. Radioaktive Chemikalien

<sup>51</sup>Chrom

Fa. Amersham Biosciences (Freiburg, D)

## 2.1.4. Reagenziensätze

Zellisolation mittels der MACS-Methode:

B Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-1 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-2 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
BDCA-4 Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD4+ T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD45RO MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD8 MicroBeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
IFN- $\gamma$ Secretion Assay	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Monocyte Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
NK Cell Isolation Kit II	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Pan T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
TCR $\gamma/\delta$ MicroBead Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

RNA Isolation, reverse Transkription und PCR:

First-Strand cDNA Synthesis Kit	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
High Pure RNA Isolation Kit	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)
LightCycler FastStart DNA Sybr Green I	Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D)

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA:

human IL-12 p70 ELISA	Fa. Bender Med Systems (Wien, A)
human IFN- $\gamma$ ELISA	Fa. Endogen (Boston, USA)
human IFN- $\alpha$ ELISA	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)

## 2.1.5. Materialien für die Zellkultur

Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA)
Humanes Serum-Albumin (HSA)	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i> (IMDM)	Fa. PAA (Linz, A)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)

## Plastikmaterialien für die Zellkultur

Fa. Greiner (Frickenhausen, D)  
 Fa. Falcon (Heidelberg, D)  
 Fa. Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F)  
 Fa. Bibby Sterilin (Staffordshire, GB)  
 Fa. Corning (Corning, USA) bezogen.

## 2.1.6. Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen

Calcium-Ionomycin  
*Granulocyte-macrophage*  
*colony-stimulating factor* (GMCSF)  
 Interferon- $\beta$   
 Interferon- $\alpha$ 2a  
 Interleukin-2  
 Interleukin-4  
 Interleukin-7  
 Interleukin-12  
 Interleukin-15  
 Lipopolysaccharid (LPS)  
 (Herkunft: *Salmonella typhimurium*)  
 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)  
 Phytohämagglutinin (PHA)

Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)  
 Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)  
 Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)  
 Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA)  
 Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)  
 Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)  
 Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)  
 Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)  
 Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)  
 Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)  
 Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)  
 Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

## 2.1.7. Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet:

RPMI-Vollmedium:

100 IU/ ml Penicillin  
 100  $\mu$ g/ ml Streptomycin  
 1,5 mM L-Glutamin  
 10 Vol % FCS  
 in RPMI 1640-Medium

MACS-Puffer:

2 mM EDTA  
 0,5 Vol % BSA  
 pH 7,2  
 in PBS

Kryo-Medium:

50 Vol % IMDM-Vollmedium  
 40 Vol % Humanes AB-Serum  
 10 Vol % DMSO

IMDM-Vollmedium:

100 IU/ ml Penicillin  
 100  $\mu$ g/ ml Streptomycin  
 1,5 mM L-Glutamin  
 2 Vol % humanes A/ B-Serum  
 in IMDM-Medium

Erythrozyten-Lysepuffer:

Ortho-mune Lysereagenz  
 in PBS

TE-Puffer:

10 mM Tris Chlorid  
 1 mM EDTA  
 pH 8,0  
 in Wasser

Lösungen für molekularbiologische Methoden:Lyse-/ Bindepuffer:

4,5 M Guanidiniumchlorid  
50 mM Tris-HCl  
30 Vol % Triton X-100  
pH 6,6  
in Wasser

DNase Inkubationspuffer:

1 M NaCl  
20 mM Tris-HCl  
10 mM MnCl<sub>2</sub>  
pH 7,0  
in Wasser

Waschpuffer I:

5 M Guanidiniumchlorid  
20 mM Tris-HCl  
60 Vol % Ethanol  
pH 6,6  
in Wasser

Waschpuffer II:

20 mM NaCl  
2 mM Tris-HCl  
80 Vol % Ethanol  
pH 7,5  
in Wasser

Elutionspuffer:

Nuclease-freies  
steriles Wasser

TBE-Puffer:

89 mM Tris-Borat  
2 mM EDTA  
pH 8,3  
in Wasser



## 2.1.8. Antikörper

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper:

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Herkunft
Anti BDCA-2	BDCA-2	AC144	Miltenyi Biotec
Anti BDCA-4	BDCA-4	AD5-17F6	Miltenyi Biotec
Anti CD3	CD3	UCHT19	BD/ Pharmingen
Anti CD4	CD4	RPA-T8	BD/ Pharmingen
Anti CD8	CD8	G42-8	BD/ Pharmingen
Anti CD11c	CD11c	B-ly6	BD/ Pharmingen
Anti CD14	CD14	3E2	BD/ Pharmingen
Anti CD19	CD19	HIB19	BD/ Pharmingen
Anti CD40	CD40	5C3	BD/ Pharmingen
Anti CD45RA	CD45RA	HI100	BD/ Pharmingen
Anti CD45RO	CD45RO	UCHL1	BD/ Pharmingen
Anti CD56	CD56	B159	BD/ Pharmingen
Anti CD69	CD69	FN50	BD/ Pharmingen
Anti CD80	CD80	L307.4	BD/ Pharmingen
Anti CD83	CD83	HB15e	BD/ Pharmingen
Anti CD86	CD86	IT2.2	BD/ Pharmingen
Anti CD123	CDw123	7G3	BD/ Pharmingen
Anti HLA-A2	HLA-A0201	Poly	P. Fisch
Anti HLA-DR	HLA-DR	L243	BD/ Pharmingen
Anti IFN- $\gamma$	IFN- $\gamma$	25723.11	BD/ Pharmingen
Anti IFN- $\alpha$	IFN- $\alpha$	Poly	PBL
Anti IFN- $\beta$	IFN- $\beta$	Poly	PBL
Anti IFNR	IFN-Rezeptor	Poly	PBL
Anti IL-4	IL-4	8D4-8	BD/ Pharmingen
Anti IL-12	IL-12 p40+p70	C8.6	BD/ Pharmingen
Anti IL-15	IL-15	247 NA	R&D Systems
Anti TNF- $\alpha$	TNF- $\alpha$	mAb11	Endogen
Anti V $\gamma$ 9	V $\gamma$ 9	Immu360	Immunotech

### 2.1.9. Oligodesoxynukleotide

Komplett oder teilweise Phosphorothioat-modifizierte ODNs wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, USA) zur Verfügung gestellt. Kleine Buchstaben stehen für Verknüpfung durch Phosphorothioate, große Buchstaben für Verknüpfung durch Phosphodiester am 3'-Ende der Base. Fett gedruckt sind die jeweiligen CpG-Dinukleotide:

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')	Referenz
ODN 2006	<b>tcgtcgttttgcgttttgcgtt</b>	(Hartmann, Weeratna et al. 2000)
ODN 2216	ggGGGAC <b>CGATCGT</b> CgggggG	(Krug, Rothenfusser et al. 2001)
ODN 1826	TCCATGAC <b>CGTTCCTGACGTT</b>	(Ballas, Rasmussen et al. 1996; Ballas, Krieg et al. 2001)

### 2.1.10. Immunstimulatorische Ribonukleotide

Die verwendeten Ribonukleotide wurden durch die Firma Dharmacon and CureVac synthetisiert. Die fett gedruckten Buchstaben korrespondieren mit der immunstimulatorischen Sequenz. Für die Stimulation der Zellkulturen wurde die Ribonukleotide (200ng) mit polykationischem Polypeptid Poly-L-Arginin (P7762 von Sigma) komplexiert.

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')	Referenz
isRNA 9.2 <i>duplex</i>	AGCUUAACCU <b>GUCCUUC</b> AA UUGAAGGACAG <b>GUUAAGCU</b>	(Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005)
isRNA 9.2 <i>sense</i>	AGCUUAACCU <b>GUCCUUC</b> AA	(Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005)
isRNA 9.2 <i>antisense</i>	UUGAAGGACAG <b>GUUAAGCU</b>	(Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005)
isRNA 9.3 <i>duplex</i>	ACCUGUCCU <b>UCAAUUACCA</b> UGGUAAUUGA <b>AAGGACAGGU</b>	(Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005)
isRNA 9.3 <i>sense</i>	ACCUGUCCU <b>UCAAUUACCA</b>	(Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005)
isRNA 9.3 <i>antisense</i>	UGGUAAUUGA <b>AAGGACAGGU</b>	(Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005)
Kontroll-RNA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	(Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005)

2.1.11. Primer für die *Real-time*-PCR

Alle Primer-Paare, die in der *Real-time*-PCR eingesetzt wurden, wurden freundlicherweise von der Fa. Search-LC (Heidelberg, D) zur Verfügung gestellt. Die Charakteristika der TLR-Primer sind in nachfolgender Tabelle detailliert wiedergegeben.

Zielgen	<i>Accession Code</i>	Position des Amplikons	Amplifikations-effizienz	Genomische DNA (5 ng/ ml)	Transkripte/ $2 \cdot 10^6$ PBMCs	Transkripte/ 300 Hek 293 Zellen
TLR3	NM_003265	1505–1717	1.93	858	16,134	12
TLR7	AF245702	774–1012	1.98	563	23,972	0
TLR8	AF245703	2296–2590	1.95	831	60,790	0
TLR9	AF245704	2741–2941	1.95	853	66,799	2

## 2.1.12. Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Zelllinie	Zellart	Herkunft	Referenz
Raji	Humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie, negativ für MHC-I	ATCC	(Ohsugi, Gershwin et al. 1980)
K562	Humane Erythroblasten-Leukämie-Zelllinie, negativ für MHC-I	ATCC	(Lozzio and Lozzio 1975)
Daudi	Humane Burkitt-Lymphom-Zelllinie, negativ für MHC-I	Fisch, P (Freiburg, D)	(Ohsugi, Gershwin et al. 1980)

## **2.2. Zellulär-immunologische Methoden**

### **2.2.1. Zellkultur**

#### **2.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen**

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen CO<sub>2</sub>/ Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

#### **2.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

#### **2.2.1.3. Bestrahlung von Stimulatorzellen**

Zur Verhinderung von Zellteilungen in Stimulatorzellpopulationen wurden die jeweiligen Zellen in 2 - 3 ml Medium aufgenommen und mit 30 Gray in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU München, D) bestrahlt.

#### **2.2.1.4. Kultivierung von Tumorzelllinien**

Die Tumorzelllinien wurden in 25 - 75 ml Kulturflaschen in RPMI-Vollmedium mit FCS kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Das Medium wurde, dem Tumorzell-Wachstum entsprechend, alle zwei bis drei Tage dekantiert und durch frisches Medium substituiert. In sämtlichen Zelllinien wurde eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen.

#### 2.2.1.5. Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Aufgereinigte Zellpopulationen bzw. PBMCs wurden in 96-Well Rundboden-Platten in RPMI-Vollmedium mit 10 % FCS kultiviert. In einigen Versuchen wurden aufgereinigte Zellpopulationen mit PBMCs so kokultiviert, dass ein direkter Zell-Zellkontakt ausgeschlossen werden konnte. Hierzu wurden die zwei Populationen, getrennt durch eine Transwell-Membran, die nur den Austausch löslicher Faktoren gestattet, in 24-Well Flachboden-Platten in Kultur genommen.

In den Versuchen, in denen Peptid-spezifische  $\alpha\beta$  T-Zellen generiert wurden, wurden jeweils 3 Mio. PBMCs mit 1 Mio. CD8<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert. Hierzu wurde IMDM-Vollmedium mit 2 % humanem A/ B-Serum in 24-Well Flachboden-Platten verwendet. Die Zellkonzentration wurde, falls nicht anders angegeben, stets auf 2 Mio. Zellen pro Milliliter eingestellt.

#### 2.2.1.6. Kultivierung unter Verwendung eines semipermeablen Membransystems

Ein semipermeables Membransystem der Firma Anapore wurde für Zellkulturen in 24-Well- sowie in 96-Wellplatten verwendet. Die Porengröße der semipermeablen Membran des Systems war jeweils 0,2  $\mu$ m. Die Kulturbedingungen unter Verwendung dieses Systems waren identisch den oben beschriebenen.

### 2.2.2. Durchflusszytometrie

#### 2.2.2.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence-activated cell sorters* (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln durch einen Laserstrahl geführt.

Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht wird wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand

dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Der Laserstrahl regt das Chromophor, der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper, zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Zu diesen Fähigkeiten der FACS-Analyse kommt beim FACS-Sorter noch die Möglichkeit dazu, die so charakterisierten Zellen einzeln in Tropfen zu verpacken, diese mit einer elektrischen Ladung zu versehen und zwischen Kondensatorplatten abzulenken, sodass Zellen nach ihren Eigenschaften aufgetrennt und in verschiedene Auffanggefäße sortiert werden können.

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an Oberflächenmoleküle binden. Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörper gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch Überlappung entsteht. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. Hierbei wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlt und ermöglicht so die Kompensation. Ebenso kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen:

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Fluorescein-Isocyanat (FITC)	494 nm	518 nm
Phycoerythrin (PE)	565 nm	575 nm
Propidiumiodid (PI)	536 nm	617 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
TOPRO-3	642 nm	661 nm
Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP)	488 nm	675 nm

#### 2.2.2.2. Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden  $5 \times 10^5$  -  $3 \times 10^6$  Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Bei indirekter Fluoreszenz wurde anschließend der Inkubationsschritt, diesmal mit einem fluoreszenzgekoppeltem Isotyp-spezifischem Antikörper, wiederholt. Wenn nötig, wurde PI oder TOPRO-3 zur Anfärbung toter Zellen kurz vor der FACS-Analyse hinzugegeben. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der *Cell Quest Software* analysiert.

#### 2.2.2.3. Bestimmung von intrazellulären Molekülen

Kultur und Stimulation wurden in einer 96-Wellplatte bei 400.000 Zellen pro Well durchgeführt. 18 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen zunächst für 4 Stunden mit Brefeldin A inkubiert, um die Golgi-Aktivität dieser Zellen zu blockieren. Nach der konventionellen Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l Paraformaldehyd (Lösung A, *Fix & Perm-Reagenz*) für 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l Saponin-haltiger Lösung (Lösung B, *Fix & Perm-Reagenz*) für 15 min permeabilisiert und der entsprechende Fluoreszenz-Antikörper für die FACS-Analyse hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationsphase von 15 min bei RT wurden die Zellen erneut mit Saponin-haltigem PBS gewaschen. Die eigentliche Analyse wurde dann wie oben

beschrieben durchgeführt. Entsprechende Isotypen wurden angefertigt und bei der Analyse berücksichtigt.

#### 2.2.2.4. Proliferationsmessung mittels Durchflusszytometrie

Die Analyse der Proliferation mittels der Durchflusszytometrie gestaltet sich insofern als schwierig, als es nicht möglich ist, von dem prozentualen Anteil einer Zellpopulation an der Gesamtheit der Zellen auf eine tatsächliche stattgefundene Proliferation zurückzuschließen. Ein erhöhter prozentualer Anteil einer Zellpopulation kann zwar einerseits einer tatsächlichen Proliferation entsprechen, andererseits auch lediglich einen erhöhten Verlust von restlichen Zellen bedeuten und somit eine Proliferation vortäuschen. Eine Abhilfe schafft hier die Proliferationsmessung mittels des Farbstoffes 5-(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE). CFSE bindet spontan und irreversibel sowohl intrazelluläre als auch oberflächliche Moleküle. Bei jeder Zellteilung wird die gleiche Menge an Farbstoff an beide Tochterzellen weitergegeben, die somit halb so stark fluoreszieren wie die „elterliche“ Zelle. Mit einer geeigneten Oberflächengegenfärbung lassen sich somit gezielt bestimmte Zellpopulationen auf Proliferation untersuchen.

Um eine homogene CFSE-Färbung einer Zellpopulation zu erreichen, wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: 10 Mio. Zellen wurden in 400  $\mu$ l PBS mit einer 1  $\mu$ M CFSE-Konzentration gegeben. Anschließend wurde die Suspension durchmischt, in ein neues Gefäß überführt, um evtl. am Rand haftende, ungefärbte Zellen auszuschließen, und dann für 10 min auf Eis inkubiert. Um die Färbereaktion zu stoppen und das extrazelluläre CFSE zu blocken, wurde dann 2 ml RPMI-Vollmedium hinzugegeben und anschließend mit NaCl zweimal gewaschen.

#### 2.2.3. Aufreinigung von Zellpopulationen

##### 2.2.3.1. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Gesunden Spendern wurde 100 ml heparinisiertes Blut abgenommen, wobei pro 10 ml Blut 100  $\mu$ l Heparin verwendet wurde. Das Blut stand bei Raumtemperatur maximal 2 h, bevor daraus die Fraktion der mononukleären Zellen präpariert wurde.

Hierzu wurde das Blut auf vier Röhrchen à 50 ml verteilt, die zuvor mit je 15 ml Ficoll-Hypaque gefüllt worden waren. Anschließend wurde auf 50 ml mit sterilem,



0,9 % NaCl vorsichtig aufgefüllt, ohne dass sich dabei die drei Phasen vermischten. Nach Zentrifugation (1000 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem Blue Cap von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, Ring aus mononukleären Zellen, Ficoll, Erythrozyten. Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Blue Cap gegeben, mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (520 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe, bei denen zunächst der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 10 ml NaCl resuspendiert und jeweils zwei Suspensionen zusammenpipettiert, erneut auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert wurden (400 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor dem letzten Waschschritt wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Zuletzt wurde das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet, von denen über 95 % den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen.

#### 2.2.3.2. Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung

Bei der *Magnetically Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationsmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 min in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert wurden, werden sie gewaschen und anschließend in MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht und somit alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfelds eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden.

Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagentsätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechenden Hersteller-Protokoll verwendet.

#### 2.2.4. *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Zur Bestimmung verschiedener Proteine im Überstand von Zellkulturen wurde ein ultrasensitiver *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt.

Hierzu werden Zell-freie Kultur-Überstände abgenommen und bei Bedarf entsprechend mit Medium verdünnt. Neben einer Standardreihe mit bekannter Proteinmenge werden nun alle Proben in Wells pipettiert, die mit einem Protein-spezifischen Antikörper beschichtet sind. Während der zwei-stündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an die Antikörper. Nach drei Waschschritten wird nun ein zweiter, biotinylierter Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. Nach 30 min folgt ein weiterer Waschschriff. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernung des Konjugats durch einen weiteren Waschschriff, gibt man die Substratlösung hinzu, gebundenes Enzym wird nun zu Farbstoff umgesetzt. Die Farbintensität, die proportional zur Protein-Konzentration der Probe ist, wird dann mittels eines ELISA-Readers eingelesen. Durch die Standardreihe besteht die Möglichkeit, die genaue in der Probe enthaltene Konzentration zu errechnen.

#### 2.2.5. Zellvermittelter Zytotoxizitätstest ( $^{51}\text{Chrom}$ -Lyse-Test)

Der  $^{51}\text{Chrom}$ -Lyse-Test stellt einen quantiativen Test dar, mit dem die zytotoxische Aktivität von T-Zellen und NK-Zellen (Effektorzellen) gegenüber mit  $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Zielzellen ermittelt wird. Dazu werden Zielzellen in  $^{51}\text{Chromat6+}$  inkubiert, wobei die Zielzellen das  $^{51}\text{Chromat6+}$  aufnehmen und zu  $^{51}\text{Chromat3+}$  reduzieren. Das reduzierte  $^{51}\text{Chromat3+}$  wird nur noch langsam freigesetzt und kann von anderen Zellen nicht aufgenommen werden. Werden die Zielzellen mit den Effektorzellen koinkubiert, wird durch Zytolyse das  $^{51}\text{Chrom}$  aus den Zielzellen in den Überstand freigesetzt und kann in diesem mit Hilfe eines  $\gamma$ -Zählers gemessen werden. Da sich die

Menge des freigesetzten  $^{51}\text{Cr}$  proportional zu der Zytolyse der Zielzellen verhält, lässt sie ein Rückschluss auf die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen zu.

Zur Durchführung des Tests wurden die Zielzellen in einem 15 ml Teströhrchen abzentrifugiert, in ca. 50  $\mu\text{l}$  Medium resuspendiert und 1 h bei 37 °C mit  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (100  $\mu\text{Ci}/10^6$  Zellen) unter gelegentlichem Aufschütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 10.000 Zielzellen/ Well auf einer 96-Well Rundboden-Platte ausplattiert und die vorher ebenfalls gewaschenen Effektorzellen, in dem jeweils angegebenen Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen (E:T-Ratio), zu einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  dazugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C, wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  Überstand/ Well in Szintillationsröhrchen übertragen. In einem  $\gamma$ -Zähler wurde die Radioaktivität des Überstandes in *counts per minutes* (cpm) gemessen. Für jede markierte Zielzelllinie wurde die Spontanfreisetzung von  $^{51}\text{Cr}$  – durch alleinige Inkubation mit Medium – und die Maximalfreisetzung – durch Zugabe des Detergenz Triton-X – bestimmt. In allen Versuchen wurden biologische Triplikate angefertigt. Alle Lysetests wurden in RPMI Vollmedium mit 10 % FCS durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms. Dabei wurde die Stärke der Zytotoxizität der Effektorzellen in Prozent spezifische Lyse angegeben. Die spezifische Lyse wurde dabei wie folgt berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Experimentelle } ^{51}\text{Cr} \text{-Freisetzung (cpm)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr} \text{-Freisetzung (cpm)}}{\text{Maximale } ^{51}\text{Cr} \text{-Freisetzung (cpm)} - \text{Spontane } ^{51}\text{Cr} \text{-Freisetzung (cpm)}}$$

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Extraktion zytoplasmatischer RNA

Zur Extraktion zytoplasmatischer RNA wurden  $1 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  Zellen in kaltem PBS gewaschen und anschließend in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. Durch Zugabe von 400  $\mu$ l eines Lyse-/ Bindepuffers erfolgte die Lyse der Zellen und die gleichzeitige Inaktivierung von RNasen. Die Probe wurde anschließend auf eine Säule mit einem Glasfaservlies gegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Da nur Nukleinsäuren in dem Glasfaservlies der Säule hängen bleiben, wurde der Durchlauf verworfen. Danach wurde die zurückgebliebene DNA durch Zugabe von 100  $\mu$ l DNase-Lösung für 15 min bei RT verdaut. Die verdaut DNA und die DNase wurde durch drei Waschschrte aus dem Vlies der Säule entfernt: Erst wurde 500  $\mu$ l Waschpuffer I hinzugegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert, dann wurde 500  $\mu$ l Waschpuffer II hinzugegeben und wiederum 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Schließlich wurde ein letzter Zentrifugationsschritt mit 200  $\mu$ l Waschpuffer II für 2 min bei 13.000 g durchgeführt. Letztlich konnte die RNA aus dem Glasfaservlies eluiert werden. Hierzu wurde 50  $\mu$ l Elutionspuffer auf die Säule pipettiert und anschließend die RNA durch eine Zentrifugation für 1 min bei 8000 g aus dem Vlies herausgelöst. Die extrahierte RNA wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.3.2. Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 3,0 g Agarose mit 200 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Zugabe von 7,5  $\mu$ l Ethidiumbromid, wurde es in die vorgegebene Gelwanne gegossen und 1 h lang bei RT abgekühlt. Durch Einbringen in die Elektrophorese-Kammer wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet. Nach Entfernen der Kammer konnten die DNA-Proben mit fünffachem Ladepuffer in die Geltaschen geladen werden. Der Ladepuffer enthielt einen Farbstoff, der das Einpipettieren erleichterte und Glycerin, welches aufgrund seiner höheren Dichte das rasche Absinken in die Taschen zur Folge hatte. Nun erfolgte das Anlegen eines elektrischen Feldes, welches durch Einstellen der Stromstärke auf 90 - 100 mA und Wahl eines nicht begrenzenden Spannungswertes festgelegt wurde. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in die Nukleotidstränge interkaliert, konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente im UV-Licht (366 nm) kontrolliert werden. Somit wurden im Anschluss

an die Elektrophorese die Gele im UV-Licht mit einer Polaroidsofortbildkamera fotografiert.

### 2.3.3. Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Oligonukleotiden

Die Konzentration von RNA, DNA und Oligonukleotiden wurde mit einem Spektrometer bestimmt. Es wurde meist ein komplettes Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm der Nukleinsäure-Lösung in H<sub>2</sub>O aufgenommen und die optische Dichte beim Absorptionsmaximum um 260 nm bestimmt. Einer OD<sub>260</sub> von 1 entsprechen dann etwa 50 µg/ ml DNA bzw. 40 µg/ ml RNA bzw. 20 µg/ ml eines Oligonukleotids.

### 2.3.4. Reverse Transkription

Um über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden zu können, musste die RNA revers transkribiert und in einen cDNA (*copy*-DNA)-Einzelstrang umgeschrieben werden. Hierzu wurde der *First-Strand cDNA Synthesis Kit* von Roche Diagnostics verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien in der Endkonzentration zusammen: 10 mM Tris, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM *Deoxynucleotide Mix*, 0,04 A<sub>260</sub> U *Oligo-p(dT)<sub>15</sub> primer*, 50 U *RNase Inhibitor* und 20 U *AMV Reverse Transkriptase*.

8,2 µl der gewonnenen RNA wurden mit 11,8 µl des First-Strand Reaktionsmixes für 10 min bei 25 °C inkubiert und anschließend für 60 min auf 42 °C erhitzt. Um eine Interferenz der AMV Reversen Transkriptase mit der folgenden PCR auszuschließen, wurde der Reaktionsansatz am Ende für 5 min auf 99 °C erhitzt, um die AMV zu denaturieren. Die gewonnene cDNA wurde durch Zugabe von bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 µl gebracht und die gewonnene cDNA so als Ausgangssubstanz für die PCR verwendet.

### 2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion

#### 2.3.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Das Verfahren der PCR ermöglicht es, ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch (genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA) zu amplifizieren. Diese spezifische, zu amplifizierende DNA-Matrize wird hierbei auch als

*Template* bezeichnet. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar, das den Enden des *Templates* homolog ist. Die Reaktion durchläuft drei Schritte: 1. Denaturierung und bei doppelsträngiger DNA Aufschmelzen der beiden Stränge der Matrizen-DNA (Denaturierung), 2. Spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA (Anlagerung) und 3. Von den Primern ausgehende DNA-Synthese (Elongation). Das so synthetisierte DNA-Fragment kann in der darauffolgenden Amplifikationsrunde als Matrize für den anderen Primer dienen. Dadurch ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich. Für die PCR Reaktion wurde das *LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I Kit* von Roche Diagnostics nach folgendem Ansatz verwendet:

Reagenz	Menge	Endkonzentraion
cDNA	10 $\mu$ l	
dATP	} je 2 $\mu$ l	200 $\mu$ M
dGTP		200 $\mu$ M
dCTP		200 $\mu$ M
dUTP		200 $\mu$ M
Polymerase		2 U
PCR-Puffer		
MgCl <sub>2</sub>		2 mM
SYBR Green I		
Primer <i>sense</i>	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Primer <i>antisense</i>	1 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	6 $\mu$ l	

#### 2.3.5.2. *Hot-start*-Verfahren

Zu Beginn der PCR kommt es, wegen den anfänglich noch niedrigeren Temperaturen, zu unerwünschten Effekten wie Fehlhybridisierung der Primer oder Primerdimerbildung, die im weiteren Verlauf zu einer geringen Ausbeute oder zu unspezifischen Produkten führen. Mit dem *hot-start*-Verfahren kann man diesem Problem begegnen, indem man die DNA-Polymerase erst hinzufügt, wenn die richtige Arbeitstemperatur erreicht wird. Eine alternative Methode ist es, die Polymerase durch hitzelabile Kofaktoren so zu behindern, dass sie erst bei deren Denaturierung aktiv wird. Ein solches Verfahren wurde in dieser Arbeit mit dem Einsatz der *FastStart Taq DNA Polymerase* von Roche Diagnostics angewendet. So wurde eine zweiminütige Denaturierungsphase von 95 °C jeder PCR vorgeschaltet, um eine optimale Aktivierung der Polymerase zu erzielen.

### 2.3.5.3. *Touch-down*-Verfahren

Eine weitere Modifikation der PCR, die eine Fehlhybridisierung der Primer am Anfang der PCR verhindern kann, ist das sogenannte *Touch-down*-Verfahren. Da sich Fehlhybridisierungen, die zu einem frühen Zyklus stattfinden, besonders stark in das quantitative Ergebnis einer PCR auswirken, ist es von Vorteil, besonders in der frühen Phase der PCR für eine hohe Spezifität zu sorgen. Dies lässt sich unter anderem dadurch erreichen, dass man eine höhere Primer-Anlagerungstemperatur in der ersten Hälfte der PCR wählt und diese dann schrittweise der optimalen Anlagerungstemperatur der Primer über mehrere Zyklen angleicht. Somit kommt es zwar zu Beginn der Reaktion zu einer geringeren Amplifikation des *Templates*, doch wird die Spezifität der PCR hierdurch deutlich verbessert.

In dieser Arbeit wurde die Anlagerungstemperatur initial 10 °C höher als vorgesehen gewählt und dann kontinuierlich in 0,5 °C Schritten in 20 Zyklen auf das eigentliche Primer-Optimum gesenkt.

Die Primer, die in dieser Arbeit benutzt wurden, wurden so konzipiert, dass sie alle in dem gleichen Zyklus-Protokoll eingesetzt werden konnten:

	Zyklus	Denaturierung		Anlagerung		Elongation	
Aktivierung der Polymerase	0	95 °C	120 s	-	-	-	-
<i>Touch-down</i> -PCR	1 - 20	95 °C	1 s	68 °C *	10 s	72 °C	16 s
	21 - 40	95 °C	1 s	58 °C	10 s	72 °C	16 s

\* Zyklus 1 - 20: -0,5 °C pro Zyklus

### 2.3.5.4. *Real-time*-PCR

Die PCR wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression bestimmter Proteine treffen zu können. Eine Quantifizierung mittels konventioneller PCR ist jedoch nur möglich, solange sich die PCR-Reaktion im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet - d.h. es findet pro Zyklus eine Verdoppelung des entsprechenden *Templates* statt. In der Plateauphase der PCR-Reaktion lässt sich oft ein ursprünglicher Mengenunterschied der entsprechenden DNA-Matrize nicht mehr feststellen. Die Plateauphase wird bei jeder PCR-Reaktion unterschiedlich schnell erreicht und kann deshalb nur sehr schwer überprüft werden. Hierzu müsste man nach jedem PCR-Zyklus ein Aliquot aus der Reaktion entfernen und zur Quantifizierung auf ein Gel auftragen, ohne jedoch die Bedingungen der

PCR-Reaktion zu beeinflussen. Diese Überprüfung entfällt, wenn die gebildete DNA-Menge während der PCR im Reaktionsansatz gemessen werden kann. Dies ist mit Hilfe der *Real-time*-PCR möglich. Vor Beginn der PCR wird zu jeder Probe ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben, der sich nur an doppelsträngige DNA anlagern kann. Nach jeder Elongationsphase werden die Proben, die sich in Glaskapillaren befinden, mit einem Laser angeregt und emittieren so, proportional zur gebildeten DNA-Menge, ein Signal. Das Fluoreszenzsignal wird mit einer entsprechenden Linse gemessen und von einem Computer gespeichert. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität wird dann gegen die Zykluszahl aufgetragen. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, lässt sich schließlich auf die ursprüngliche Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe zurückschließen. Um letztlich eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines sogenannten Referenzgens bezogen, welche in jeder Probe zusätzlich bestimmt wird. Das Referenzgen wird hierbei so gewählt, dass dessen Expression nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst wird.

Da manche der TLR-Primer auch genomische DNA detektieren, wurde zusätzlich eine Qualitätskontrolle durchgeführt, um die Amplifikationseffizienz der Primerpaare zu vergleichen. Hierzu wurden jeweils 5 ng genomische DNA (entspricht ca. 1500 genomischen Kopien) als *Template* eingesetzt und die Kopienzahl nach Amplifikation bestimmt. Die hierbei detektierte Kopienzahl lag mit 561 bis 1791 Transkripten nah an der zu erwartenden Zahl von 1500 Kopien. Nimmt man in Betracht, dass es durch einen PCR-Zyklus zu einer ca.  $16 \times 10^6$  fachen Vervielfältigung eines *Templates* kommt, so demonstrieren diese Werte die Genauigkeit der durchgeführten PCR. Ferner, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde von zufällig ausgewählten Proben eine sogenannte „minus RT-Probe“ angefertigt. Bei diesen Proben wurde der Umschrieb der mRNA in cDNA unterlassen und anschließend diese Proben als *Template* in einer PCR-Reaktion eingesetzt. In keiner dieser Proben kam es zu einer Amplifikation des mutmaßlichen Zielgens, so dass eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte. Jede Probe wurde in zwei unabhängigen Ansätzen gemessen und der entsprechende Mittelwert gebildet. Die Kopienzahlen der detektierten Zielgene wurden schließlich auf das Referenzgen Cyclophilin-B normalisiert und als Kopienzahlen pro 1000 Kopien Cyclophilin-B angegeben. Die Charakteristika der verwendeten Primer ist unter Absatz 2.1.11. (Primer für die *Real-time*-PCR) angegeben.



## 2.4. Statistische Analyse

Bei multiplen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) dargestellt werden. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $< 0,05$  bzw  $p < 0,01$  angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten entstand mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA).



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Zytokin-Induktion einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunantwort

3.1.1. Die Stimulation mit immunstimulatorischer RNA induziert eine T<sub>H</sub>1-gerichtete Immunantwort in peripheren mononukleären Zellen des Blutes

Die Zytokin-Induktion durch Zellen des Immunsystems ist für eine adäquate Immunreaktion von entscheidender Bedeutung. Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde, induzieren die vom Immunsystem als *Fremd* erkannten Pathogene unterschiedliche Zytokin-Muster und leiten somit bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Immunreaktion die für den entsprechenden Stimulus geeignete Abwehr ein. Für die Elimination Virus-infizierter Zellen und maligne-veränderter Zellen ist die zelluläre, T<sub>H</sub>1-gerichtete Immunantwort verantwortlich. Die T<sub>H</sub>1-Antwort zeichnet sich unter anderem durch die Aktivierung von CTLs genauso aus wie die von NK-Zellen durch Typ I und Typ II IFN aus.

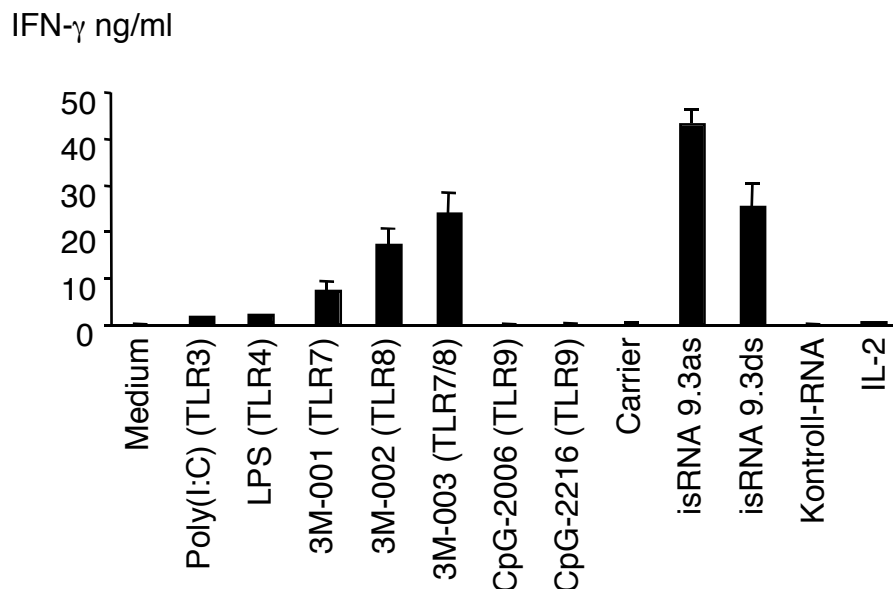
Eine solche IFN-Induktion ist in den vergangenen Jahren im Detail für CpG-ODN via TLR9 in der Literatur beschrieben worden. Zusätzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass darüber hinaus isRNA zu einer starken Induktion des Typ I IFN IFN- $\alpha$  führt. Diese Effekte werden auf die Stimulation von TLR7 zurückgeführt. IFN- $\gamma$  ist ein essentielles Zytokin bei der Immunreaktion gegen maligne-entartete und viral-infizierte Zellen (Moretta 2002). Durch Stimulation mit TLR9-Agonisten im humanen System kommt es jedoch zu keiner nennenswerten Induktion von IFN- $\gamma$ .

Welche weiteren Zytokine durch isRNA in Zellen des Immunsystems induziert werden und ob diese miteinander korrelieren, war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit nicht untersucht. Es war daher unser Interesse, die Zytokinreaktion auf eine Stimulation mit isRNA, insbesondere hinsichtlich des IFN- $\gamma$ , genau zu charakterisieren. Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden PBMCs mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert und die Zytokin-Induktion von IFN- $\gamma$  mit der durch isRNA hervorgerufenen Induktion verglichen.

##### 3.1.1.1. Induktion von IFN- $\gamma$

Die Ergebnisse der Versuchsreihen zur IFN- $\gamma$ -Induktion in PBMCs zeigten, dass IFN- $\gamma$  durch Poly(I:C), IL-2, 3M-001, 3M-002, 3M-003, isRNA 9.3as and isRNA 9.3ds

induziert werden konnte, wobei unter den verwendeten Stimuli isRNA 9.3as der stärkste Induktor von IFN- $\gamma$  war (Abbildung 4). Die jeweiligen Stimuli wurden hierbei jeweils in einer Konzentration eingesetzt, mit der die maximale Zytokin-Induktion in PBMCs erreicht wurde. Die beobachtete starke Induktion IFN- $\gamma$  durch isRNA 9.3as war Sequenz-spezifisch, da die verwendete Kontroll-RNA, bestehend aus Wiederholungen von Adeninen, keines der untersuchten Zytokine induzieren konnte. Weniger ausgeprägt war eine Induktion von IFN- $\gamma$  für die synthetischen TLR-Agonisten zu beobachten, wobei die Stimulation von TLR7 alleine die geringste, die Stimulation von TLR7 und TLR8 die meiste Induktion der drei Liganden hervorrief. Die CpG-DNAs (TLR9-Agonisten) führten zu keiner Induktion von IFN- $\gamma$ .



**Abb. 4** isRNA 9.3as induziert IFN- $\gamma$  innerhalb von PBMCs

PBMCs wurden von vier gesunden Spendern gewonnen und mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert (Poly(I:C) 20  $\mu$ g/ml, 3M-001, 3M-002, 3M-003 jeweils 10  $\mu$ M, CpG-2216 und CpG-2006 jeweils 3  $\mu$ g/ml, isRNA 9.3as und isRNA 9.3ds 1  $\mu$ g/ml sowie das zur Transfektion verwendete Carrier-Protein, einer Kontroll-RNA in gleicher Konzentration wie die isRNAs und IL-2 2000U/ml). Die Mittelwerte und der SEM von vier Spendern sind gezeigt; Kultur und Stimulation fanden in einer 96-Wellplatte bei 400.000 Zellen/Well statt, die IFN- $\gamma$ -Messungen wurden aus den Überständen der Zellkulturen mittels ELISA nach 36 Stunden Stimulation durchgeführt.

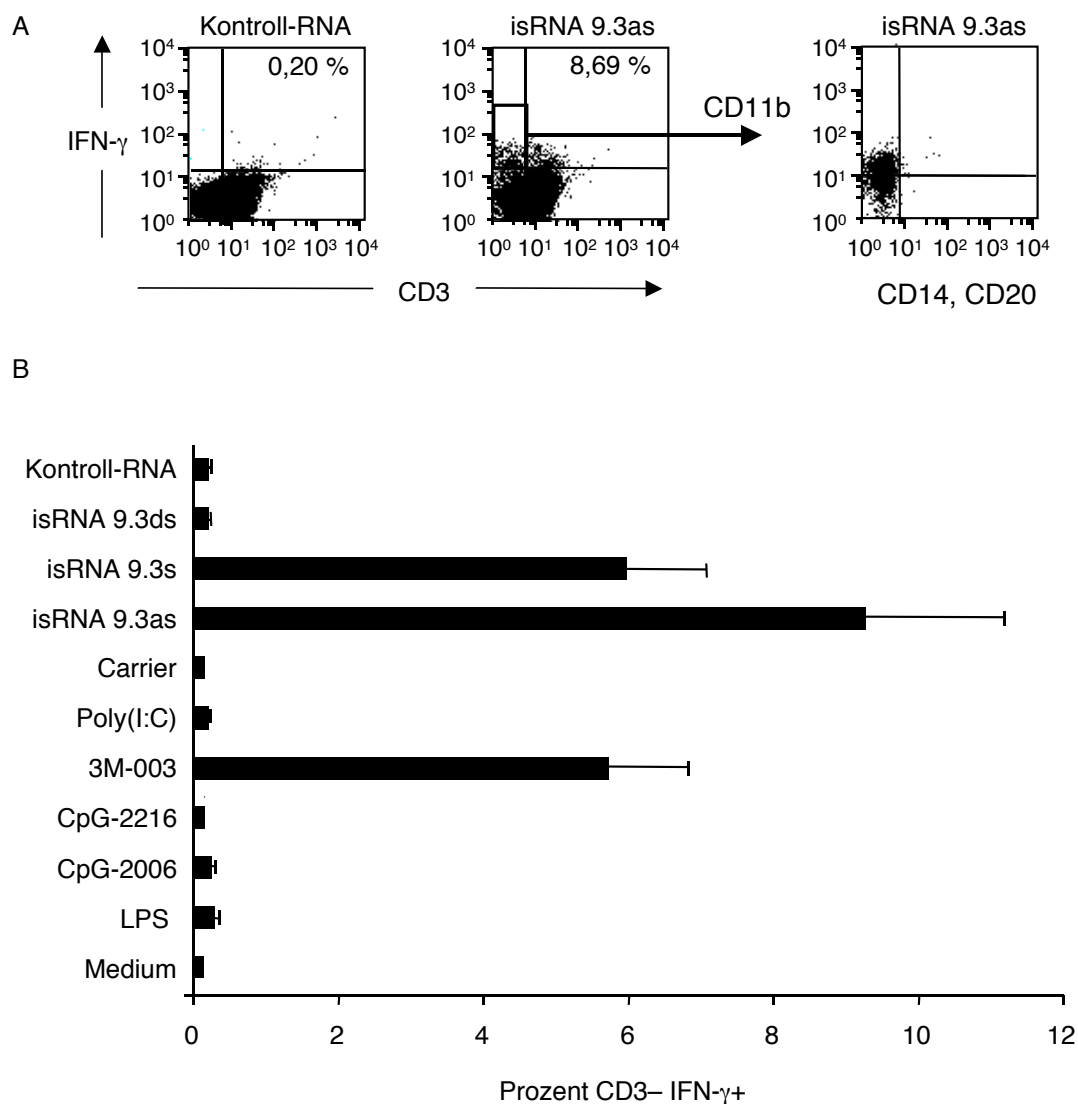
### 3.1.2. Natürliche Killerzellen und T-Zellen sind die Produzenten von IFN- $\gamma$

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass es durch die Stimulation mit isRNA 9.3as innerhalb von PBMCs zu einer hohen IFN- $\gamma$ -Produktion gekommen war, sollte nun geklärt werden, welche der Immunzellpopulationen für die beobachtete IFN-Produktion verantwortlich waren. Zellpopulationen, die prinzipiell durch die Produktion von IFN- $\gamma$  regulatorische und funktionelle Wirkungen im Immunsystem hervorrufen, sind  $\alpha\beta$ - und  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie NK-Zellen (Trinchieri, Santoli et al. 1978).

Um die IFN- $\gamma$ -produzierende Zellfraktion genau identifizieren zu können, wurden zunächst die Gesamtpopulationen der mononukleären Blutzellen stimuliert und IFN- $\gamma$  mit Anti-IFN- $\gamma$ -Antikörpern intrazellulär markiert und Oberflächenproteine dieser Zellpopulationen (CD3 für T-Zellen, CD11b u. a. für NK-Zellen, CD14 für Monozyten und CD20 für B-Zellen) zur weiteren Charakterisierung gefärbt. Mittels FACS-Analyse konnte somit durch das dargestellte Expressionsmuster auf die jeweiligen Zellpopulationen zurückgeschlossen werden. Bevor die intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Produktion durch Antikörperfärbungen konkreten Zellpopulationen zugeordnet wurde, sollte zunächst der exakte Zeitpunkt der maximalen IFN- $\gamma$ -Produktion nach Stimulation mit TLR-Liganden ermittelt werden. Die ELISA-Messungen der Zytokine im Überstand der Zellkultur nach Stimulation mit TLR-Liganden hatten gezeigt, dass nach 36 Stunden bereits ein sehr hoher Wert an IFN- $\gamma$  im Überstand erreicht wurde. Ein Experiment, dass die intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Synthese in PBMCs nach 6, 12, 18 und 24 Stunden Stimulation erfasste, zeigte die stärkste IFN- $\gamma$ -Produktion intrazellulär 18 Stunden nach Stimulation (Daten werden nicht gezeigt). Dementsprechend wurde dieser Zeitpunkt in den folgenden Versuchen zur intrazellulären IFN- $\gamma$ -Synthese als Abnahmewert verwendet.

Für die intrazelluläre Färbung wurden zunächst PBMCs stimuliert. Während die Mediumkontrolle sowie die Kontrolle mit dem Carrier-Protein alleine analog zu den Versuchen der ELISA-Messungen im Überstand kein IFN- $\gamma$  induzierte, fanden sich durch die Stimulation mit den TLR-Liganden 3M-003 (TLR7 und TLR8) und isRNA 9.3as eine deutliche Zytokin-Induktion. Die Analyse der Markierung durch den Anti-CD3-Antikörper ergab, dass sowohl eine CD3+ als auch eine CD3- Zellpopulation nach Stimulationen mit isRNA 9.3as IFN- $\gamma$  produzierte. Analysen aus weiteren Versuchen zeigten, dass innerhalb der CD3+ Population (gesamte T-Zellen) sowohl T-Helferzellen und CTLs als auch  $\gamma\delta$ -T-Zellen IFN- $\gamma$  produzierten (Daten nicht gezeigt). Die weitere Analyse der CD3-, IFN- $\gamma$ + Zellpopulation zeigte, dass diese Zellen positiv

für den NK-Zellmarker CD11b und negativ für den Monozytenmarker CD14 und B-Zellmarker CD20 waren (Abbildung 5A). Diesen Ergebnissen zufolge waren T-Zellen sowie NK-Zellen (CD3–, CD11b+, CD14– und CD20– und positiv für IFN- $\gamma$  nach Stimulation), für die Produktion des IFN- $\gamma$  durch Stimulation mit TLR-Liganden verantwortlich (Abbildung 5B).

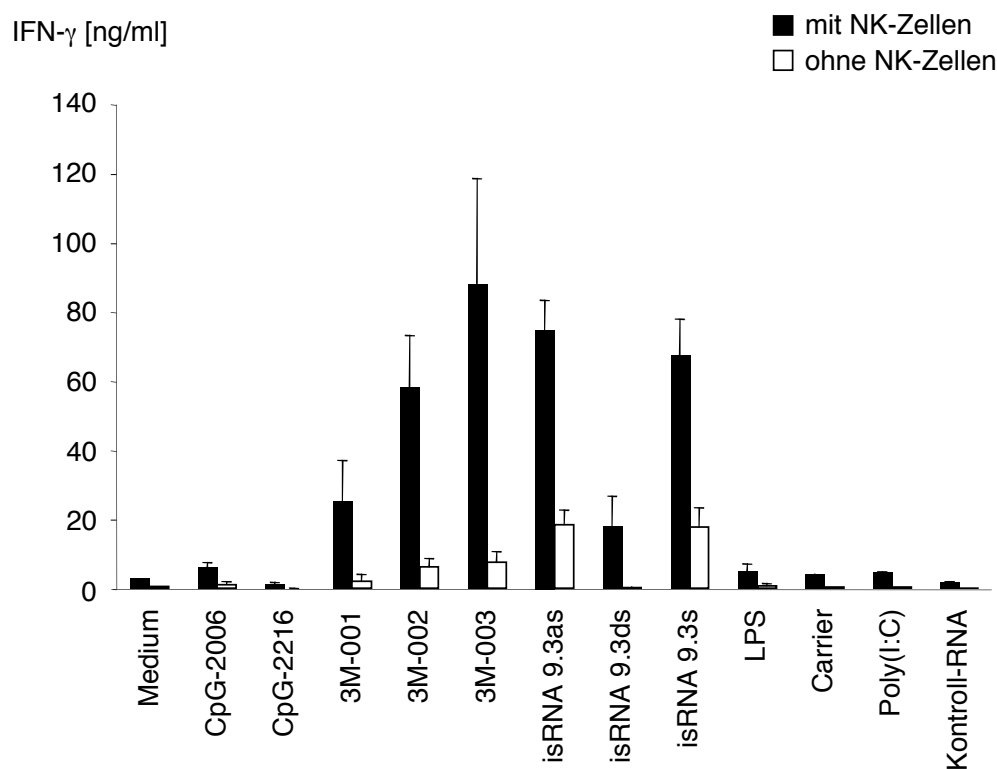


**Abb. 5 NK-Zellen sind für die Induktion des IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit isRNA 9.3as verantwortlich**

PBMCs wurden wie oben beschrieben kultiviert und stimuliert. Anschließend wurde eine intrazelluläre FACS-Analyse auf IFN- $\gamma$  durchgeführt (siehe Material und Methoden). Ein repräsentatives Experiment (**A**) und die Mittelwerte und SEM von drei Spendern sind gezeigt (**B**).

### 3.1.2.1. Die Depletion von NK-Zellen aus PBMCs führt zu einer verminderten Produktion von IFN- $\gamma$

NK-Zellen sind starke Produzenten von IFN- $\gamma$  (Trinchieri 1989; Moretta 2002). Die oben beschriebene intrazelluläre Färbung hatte neben T-Zellen als IFN- $\gamma$  produzierende Zellpopulation eine weitere Zellpopulation mit den Charakteristika von NK-Zellen identifiziert. Diese Zellpopulation war CD3–, CD14–, CD20–, CD11b-*high* und produzierte IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit isRNA 9.3as. Um jedoch zeigen zu können, dass diese Population tatsächlich NK-Zellen waren und welchen Einfluss sie bei der Produktion von IFN- $\gamma$  innerhalb von PBMCs nach isRNA 9.3as haben, wurden NK-Zellen aus PBMCs depletiert. Die zwei entstandenen Zellpopulationen (NK-Zell-enthaltende sowie NK-Zell-freie PBMCs) wurden mit isRNA 9.3as stimuliert und nach 36 Stunden IFN- $\gamma$  im Überstand mittels ELISA gemessen. Entsprechende Kontrollen wurden durchgeführt. PBMCs, die keine NK-Zellen enthielten, induzierten vierfach weniger IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit isRNA 9.3as im Vergleich zu gleicher Stimulation von PBMCs, deren NK-Zell-Population nicht depletiert worden war (Abbildung 6; IFN- $\gamma$  ng/ml; NK-Zell-enthaltende PBMCs:  $74,9 \pm 8,4$ , NK-Zell-freie PBMCs:  $18,4 \pm 4,3$ ).



**Abb. 6 Die Depletion von NK-Zellen innerhalb von PBMCs führt zu einer deutlichen Reduktion von isRNA-induzierter IFN- $\gamma$ -Produktion**

PBMCs wurden entweder mittels MACS von NK-Zellen depletiert (weiße Balken) oder wiederum durch erneute Zugabe der isolierten NK-Zellen mit NK-Zellen angereichert (schwarze Balken). Anschließend wurde mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert (Stimuli und Konzentrationen wie oben). Mittelwerte und SEM von drei Spendern sind gezeigt.



## 3.2. Eigenschaften der Immunstimulation

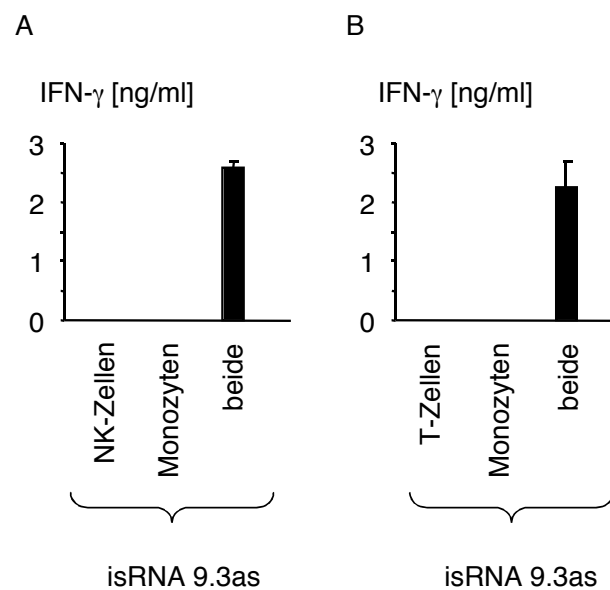
3.2.1. Die Aktivierung der Effektorzellen zur Produktion von IFN- $\gamma$  erfolgt nicht direkt, sondern ist abhängig von akzessorischen Zellen

Die bisher beschriebenen Ergebnisse ergaben eindeutig, dass neben T-Zellen auch NK-Zellen durch isRNA 9.3as zur IFN- $\gamma$ -Produktion innerhalb von PBMCs stimuliert werden können. In einem nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob diese Aktivierung auf direktem Wege erfolgt oder ob akzessorische Zellpopulationen für die Aktivierung verantwortlich sind.

3.2.1.1. Effektorzellen lassen sich durch immunstimulatorische RNA nicht direkt stimulieren

Zunächst wurden die Zellpopulationen, die als die IFN- $\gamma$  produzierenden Zellpopulationen identifiziert wurden, mittels MACS isoliert und stimuliert. Für die Isolation der NK-Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, welches zusätzlich die Verwendung von Anti-CD4-*microbeads* beinhaltete und somit eine Kontamination mit T-Helferzellen, APCs und Monozyten (alle CD4+) verhinderte. Umgekehrt wurde bei der Isolation von möglichen akzessorischen Zellen wie Monozyten ein Protokoll verwendet, das durch den Einsatz von Anti-CD56-Antikörpern eine Verunreinigung mit NK-Zellen verhinderte. Für die Aufreinigung der T-Zellen wurde kein zusätzlicher Antikörper verwendet, denn FACS-Analysen dieser Zellpopulation wiesen nach Isolation hohe Reinheiten und keine Kontaminationen mit störenden Zellpopulationen auf (Daten werden nicht gezeigt).

Die isolierten Zellpopulationen wurden stimuliert und der Überstand nach 36 Stunden mittels ELISA auf IFN- $\gamma$  untersucht, wobei isRNA 9.3as als Stimulus verwendet wurde. Weder reine Monozyten, T-Zellen noch NK-Zellen konnten direkt zur IFN- $\gamma$ -Produktion stimuliert werden. Wurden reine NK-Zellen oder T-Zellen jedoch zusammen mit reinen Monozyten kultiviert und stimuliert, kam es zu einer starken IFN- $\gamma$ -Induktion nach Stimulation mit isRNA 9.3as. Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die Aktivierung der NK-Zellen, hier charakterisiert durch die Induktion von IFN- $\gamma$ , nicht durch eine direkte Stimulation mit einem TLR-Liganden zustande gekommen war (Abbildung 7).



**Abb. 7 Effektorzellen lassen sich durch isRNA 9.3as nicht direkt stimulieren**

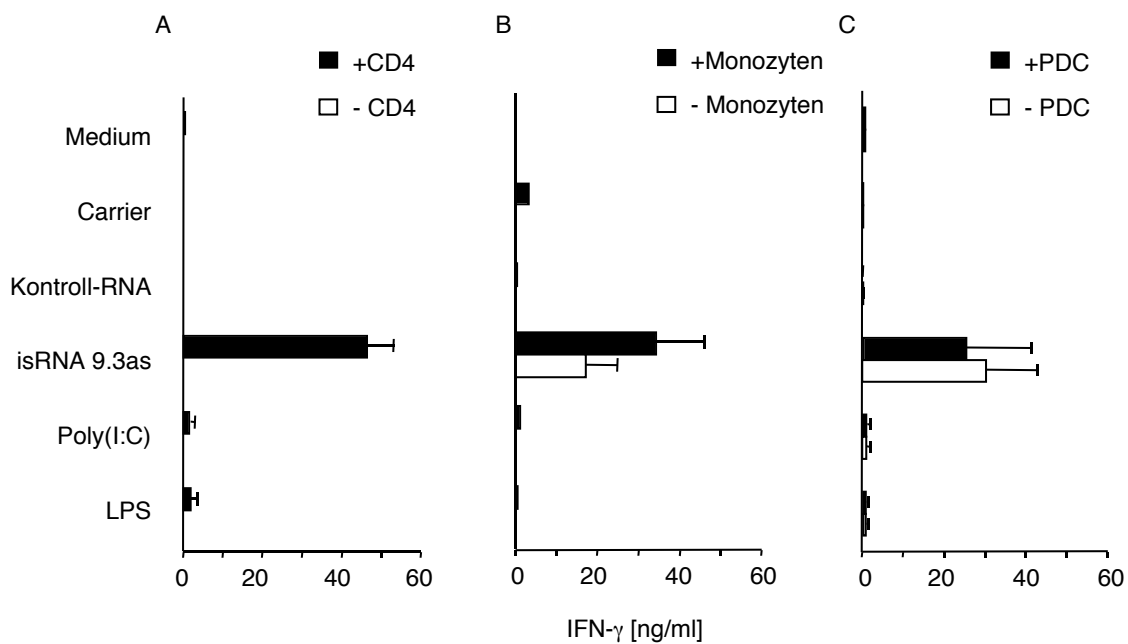
NK-Zellen (**A**) bzw. T-Zellen (**B**) wurden jeweils mit Monozyten in separater und gemeinsamer Kultur bei 100.000 Zellen/Well in 200  $\mu$ l mit isRNA 9.3as stimuliert und nach 36 Stunden mittels ELISA IFN- $\gamma$  im Überstand bestimmt. Für die Isolation der NK-Zellen aus PBMCs wurde ein modifiziertes Protokoll verwandt, das eine gegenseitige Kontamination mit störenden Zellen verhinderte und Reinheiten von bis zu 99% garantierte (Einzelheiten zum verwendeten Protokoll werden im Haupttext beschrieben). T-Zellen wurden über CD3-Selektion mittels Anti-CD3-*Microbeads* isoliert, die positive IFN- $\gamma$  Antwort bestätigte die Vitalität dieser Zellen. Mittelwerte und SEM von drei Spendern sind gezeigt.

### 3.2.1.2. Akzessorischen Zellen sind Antigen-präsentierende Zellen sowie Monozyten

Es konnte durch die separate Stimulation von NK-Zellen gezeigt werden, dass der alleinige TLR-Ligand für eine Aktivierung nicht ausreichend war und dass weitere Zellen für die Aktivierung notwendig waren. Durch Depletierungsversuche innerhalb von PBMCs sollte nun evaluiert werden, welche Charakteristika die für die Aktivierung von NK-Zellen notwendigen Zellen besitzen.

Innerhalb von PBMCs wurden über MACS unter Verwendung von entsprechenden *Antibeads* Monozyten, PDCs oder sämtliche CD4+ Zellen depletiert (Abbildung 8). Letztere Depletion beinhaltete die Eliminierung aller APCs sowie Monozyten und Makrophagen. Anschließend wurden die depletierten PBMC-Fraktionen mit isRNA 9.3as stimuliert und mit der Stimulation von kompletten PBMC-Fraktionen verglichen.

Während die Depletion von CD4+ Zellen (APC, Monozyten und Makrophagen) das IFN- $\gamma$  in PBMCs komplett inhibierte, kam es bei einer Depletion von Monozyten zur Halbierung des induzierten IFN- $\gamma$ . (IFN- $\gamma$  ng/ml; PBMCs mit Monozyten:  $34,2 \pm 13,8$ , ohne Monozyten:  $17,0 \pm 9,8$ ). Die Depletion von PDCs hingegen hatte keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -Produktion in PBMCs (IFN- $\gamma$  ng/ml; PBMCs mit PDCs:  $25,1 \pm 11,4$ , ohne PDCs:  $30,3 \pm 8,8$ ). Somit konnten wir zeigen, dass die Aktivierung der Effektorzellen zur Produktion von IFN- $\gamma$  nicht direkt erfolgte, sondern von akzessorischen Zellen abhängig war. Monozyten konnten als eine Population von akzessorischen Zellen identifiziert werden.



**Abb. 8 Die Depletion von Monozyten innerhalb von PBMCs identifiziert diese Zellpopulation als akzessorische Zelle für die indirekte Aktivierung durch isRNA 9.3as**

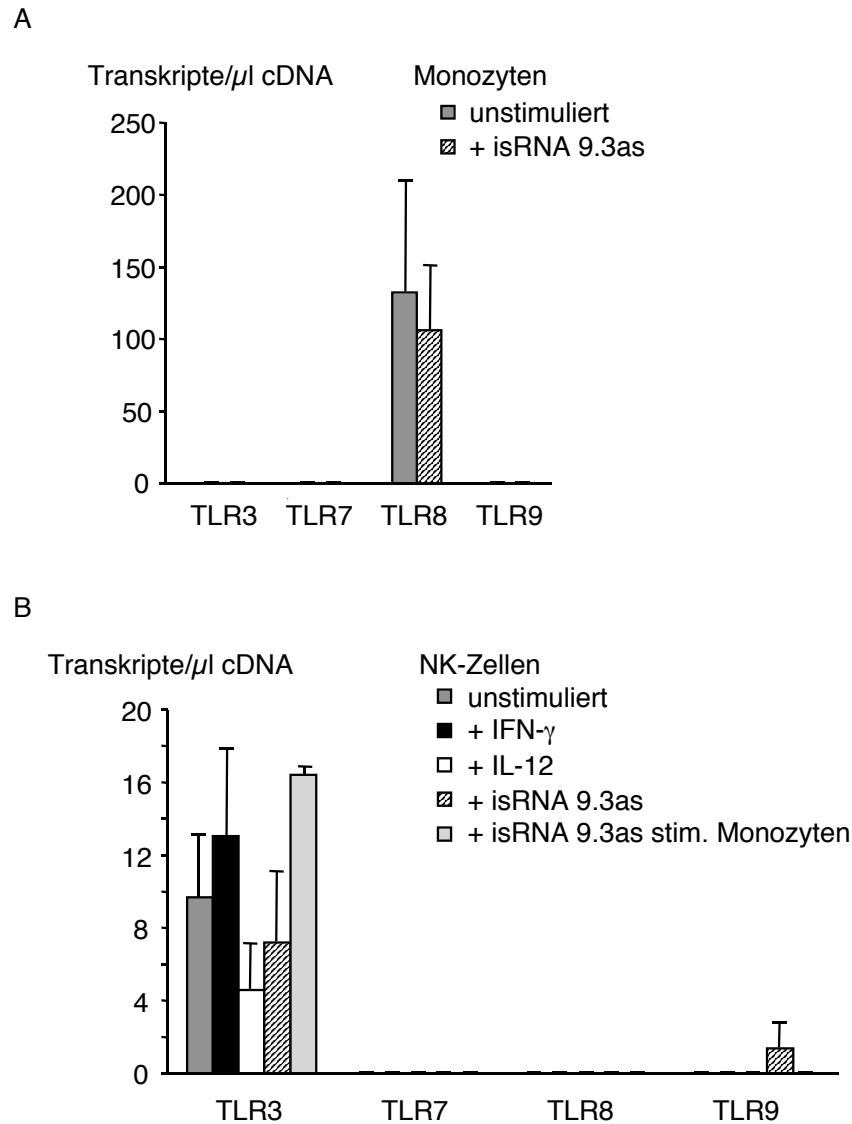
PBMCs wurden von zwei gesunden Spendern gewonnen. Mittels MACS wurden CD4+ Zellen (A), Monozyten (B) oder PDCs (C) aus PBMCs depletiert. Durch erneute Zugabe der isolierten Zellen zu einem Teil der depletierten PBMCs wurde entsprechend jeweils eine depletierte Zellpopulation enthaltende (schwarze Balken) und eine depletierte Fraktion (weißer Balken) generiert. Anschließend wurde mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert (isRNA 9.3as 1  $\mu$ g/ml, Poly(I:C) 20  $\mu$ g/ml, LPS 1  $\mu$ g/ml sowie das zur Transfektion verwendete Carrier-Protein und einer Kontroll-RNA in gleicher Konzentration wie die isRNA). Mittelwerte und SEM von zwei Spendern sind gezeigt, Kultur und Stimulation fanden in einer 96-Wellplatte bei 400.000 Zellen/Well statt, die IFN- $\gamma$  Messungen wurden aus den Überständen der Zellkulturen mittels ELISA nach 36 Stunden Stimulation durchgeführt.

### 3.2.2. Die Vorstimulation mit immunstimulatorischer RNA hat keinen Einfluss auf die *Toll-like*-Rezeptor-Expression

Es wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben, dass mikrobielle Stimuli die Expression ihrer zugehörigen PRRs beeinflussen (Poltorak, Smirnova et al. 1998; Muzio, Bosisio et al. 2000; Nomura, Akashi et al. 2000; Visintin, Mazzone et al. 2001). Daten unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die Stimulation mit CpG-ODN bzw. die Inkubation mit gewissen Zytokinen die Expression der mRNA von TLR7 und TLR9 auf PDCs und B-Zellen verändern (Hornung, Rothenfusser et al. 2002). Es musste also angenommen werden, dass eine Stimulation mit isRNA in unserem System zu einer Veränderung der Expression der für die Aktivierung verantwortlichen TLRs führte und somit das Reaktionsmuster dieser Zellen beeinflusst.

Um den Einfluss auf das Expressionsmuster der TLRs auf NK-Zellen und Monozyten durch Stimulation mit isRNA zu untersuchen, wurde die Expression zytoplasmatischen mRNA für diese TLRs mittels *Real-time*-PCR analysiert (Abbildung 9). Besonderes Augenmerk wurde auf die TLRs gelegt, die durch Nukleinsäuren stimuliert werden können. Diese sind TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9.

Unsere Untersuchungen ergaben analog zu der bereits etablierten Literatur eine konstitutive Expression von TLR3 auf NK-Zellen und TLR8 auf Monozyten, jedoch wurde auf keinem der beiden Zelltypen TLR7 oder TLR9 gefunden (vergleiche mit (Hornung, Rothenfusser et al. 2002)). Weder die Stimulation aufgereinigter NK-Zellen jeweils mit rekombinantem IFN- $\gamma$ , rekombinantem IL-12 und isRNA 9.3as noch die Stimulation von Monozyten mit isRNA 9.3as führten zu einer Veränderung gegenüber der konstitutionellen Expression von TLR3 und TLR8 in diesen Zelltypen.



**Abb. 9 Von den Nukleinsäure sensitiven TLRs exprimieren Monozyten alleinig TLR8 und NK-Zellen alleinig TLR3**

In **(A)** ist das TLR-Expressionsmuster von stimulierten und unstimulierten Monozyten für TLR3, TLR7, TLR8, und TLR9 dargestellt. Es wurde für 12 Stunden mit isRNA stimuliert. In **(B)** ist das TLR-Expressionsmuster von NK-Zellen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  1000U/ml, IL-12 1ng/ml oder isRNA 9.3as 1 $\mu$ g/ml dargestellt. In der Bedingung „+ isRNA 9.3as stim. Monozyten“ wurden NK-Zellen mit Monozyten kokultiviert und durch ein Transmembransystem in der Kultur voneinander getrennt. Die Monozyten wurden in dieser Bedingung mit isRNA stimuliert. In **(A)** und **(B)** sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten als mittlere Transkriptionszahl der adjustierten Transkripte pro Microliter cDNA angegeben  $\pm$  SEM.

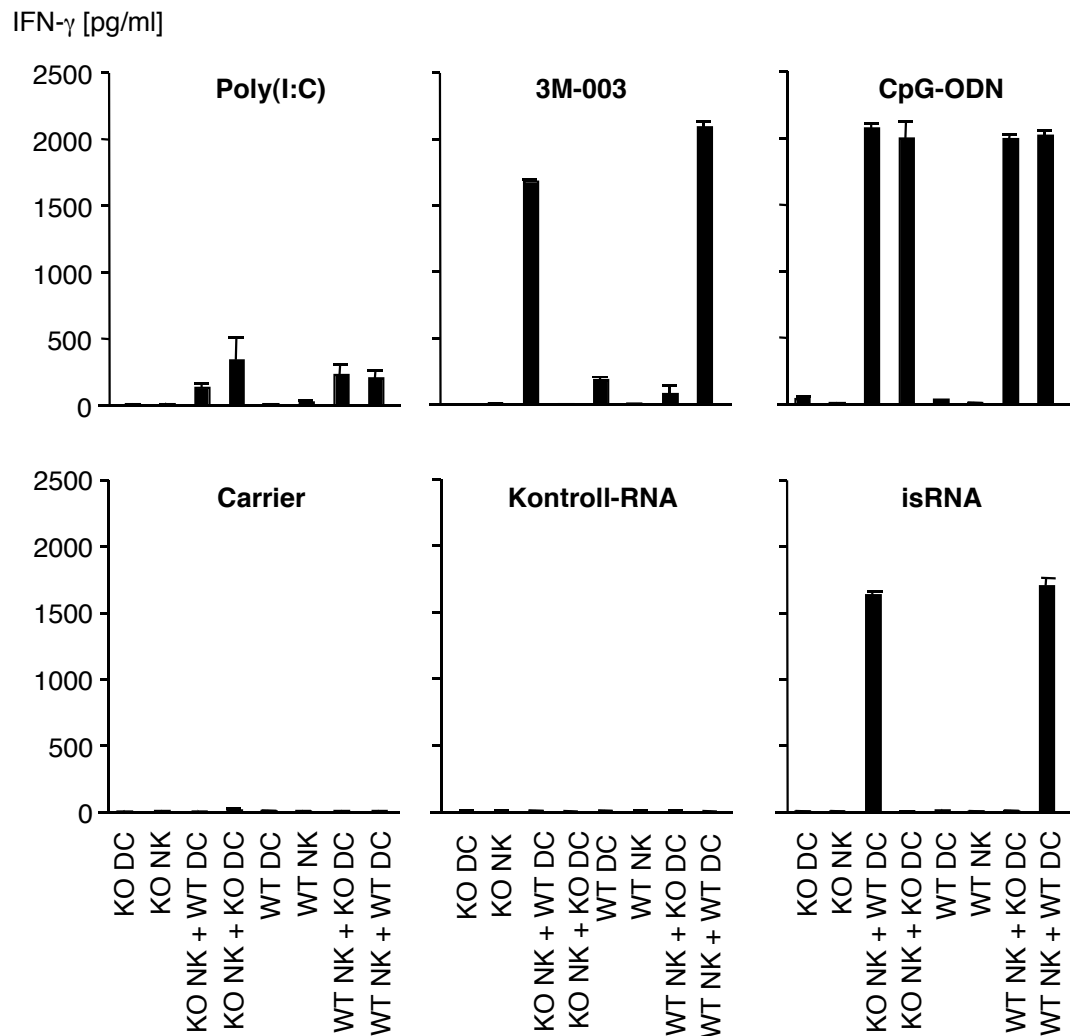
### 3.2.3. Die indirekte Aktivierung der Natürlichen Killerzellen ist im murinen System abhängig von *Toll-like*-Rezeptor 7

Frühere Publikationen von Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Induktion von Zytokinen durch isRNA im murinen System über die Aktivierung von TLR7 der PDCs vermittelt wird (Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005). Die oben aufgeführten Ergebnisse im humanen System weisen ebenfalls darauf hin, dass es durch isRNA 9.3as zu keiner direkten Aktivierung von Effektorzellen gekommen war, sondern dass die Aktivierung über TLR7 und TLR8 auf akzessorischen Zellen wie Monozyten und DCs vermittelt wurde.

Um die Mechanismen der Aktivierung durch den von uns verwendeten Liganden detailliert darstellen zu können, sollten jetzt im murinen System unter Verwendung von Zellen, isoliert aus TLR7-*Knockout*-Mäusen, weitere Experimente durchgeführt werden. Es wurden Zellen lediglich aus TLR7-*Knockout*-Mäusen verwendet, weil die Stimulation von TLR8 in murinen Zellen durch RNA bisher nicht gelungen ist (Gorden, Qiu et al. 2006). Als Aktivierungsmarker wurde IFN- $\gamma$  im Überstand bestimmt.

Durch Isolation mittels MACS wurden aus TLR7-*Knockout*- und Wildtyp-Mäusen folgende vier Zellpopulationen gewonnen: DC TLR7+/+, DC TLR7-/-, NK-Zellen TLR7+/+, NK-Zellen TLR7-/- (DC = dendritische Zelle). Anschließend wurden die verschiedenen Zellpopulationen in vier Kombinationen miteinander kultiviert (DC TLR7+/+ mit NK-Zellen TLR7+/+; DC TLR7+/+ mit NK-Zellen TLR7-/-; DC TLR7-/- mit NK-Zellen TLR7+/+; DC TLR7-/- mit NK-Zellen TLR7-/-) und mit Poly(I:C), 3M-003, CpG-1826 und isRNA 9.3as stimuliert (Abbildung 10).

NK-Zellen sowohl von TLR7-*Knockout*- als auch Wildtyp-Mäusen konnten nach Stimulation mit TLR7-Liganden (hier 3M-003 und isRNA 9.3as) immer dann IFN- $\gamma$  produzieren, wenn sie zusammen mit DCs kultiviert waren, die über einen funktionellen TLR7 verfügten. Diese Induktion wurde jedoch komplett unterdrückt, wenn DCs aus TLR7-*Knockout*-Mäusen isoliert wurden, unabhängig des Status der NK-Zellen bezüglich TLR7. CpG-ODNs führten TLR7-unabhängig zu einer IFN- $\gamma$ -Produktion über TLR9. Die Stimulation mit Poly(I:C) erfolgte ebenfalls unabhängig von TLR7. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass im murinen System die Aktivierung von NK-Zellen von TLR7 auf akzessorischen Zellen abhängig war. Sie bestätigten darüber hinaus, dass es wie für das humane System auch im murinen System zu keiner direkten Stimulation der NK-Zellen durch Liganden für TLR7 und TLR9 kam.



**Abb. 10 Die indirekte Aktivierung der Effektorzellen ist im murinen System TLR7-abhängig**

Durch Isolation mittels MACS wurden aus TLR7-Knockout- und Wildtyp-Mäusen vier verschiedene Zellpopulationen gewonnen (DC TLR7<sup>+/+</sup>, DC TLR7<sup>-/-</sup>, NK-Zellen TLR7<sup>+/+</sup>, NK-Zellen TLR7<sup>-/-</sup>, DC = dendritische Zellen). Anschließend wurden die verschiedenen Zellpopulationen in vier Kombinationen miteinander kultiviert (DC TLR7<sup>+/+</sup> mit NK-Zellen TLR7<sup>+/+</sup>; DC TLR7<sup>+/+</sup> mit NK-Zellen TLR7<sup>-/-</sup>; DC TLR7<sup>-/-</sup> mit NK-Zellen TLR7<sup>+/+</sup>; DC TLR7<sup>-/-</sup> mit NK-Zellen TLR7<sup>-/-</sup>) und mit Poly(I:C), 3M-003, CpG-1826 und isRNA 9.3as stimuliert. WT = Wildtyp, KO = *Knockout*



### 3.2.4. Das Verhältnis akzessorischer Zellen zu Natürlichen Killerzellen sowie die Art des *Toll-like*-Rezeptor-Liganden entscheidet über das Ausmaß der Aktivierung

Die obigen Ergebnisse konnten zeigen, dass NK-Zellen nicht direkt durch isRNA 9.3as aktiviert werden, sondern dass zusätzlich Zellen nötig waren. Es konnte ferner gezeigt werden, dass das Fehlen von Monozyten im Zellverband zu einer geringeren Aktivierung von NK-Zellen führte, und dass das Zusammenführen von reinen NK-Zell-Populationen mit reinen Monozyten eine Aktivierung ersterer ermöglichte. In einem nächsten Schritt sollte nun durch ein Experiment das Ausmaß der Aktivierung von NK-Zellen durch isRNA 9.3as mit anderen TLR-Liganden verglichen werden. Gleichzeitig sollte die Aktivierung bei unterschiedlichem Verhältnis von akzessorischen Zellen und NK-Zellen sowie zu verschiedenen Zeiten untersucht werden, um eventuelle Unterschiede im Zeitpunkt der Aktivierung darstellen zu können. In einem letzten Schritt wurde untersucht, welche Unterschiede in der Aktivierung durch die Verwendung von Monozyten gegenüber PDCs als akzessorische Zellen bestehen.

#### 3.2.4.1. Die Produktion von IFN- $\gamma$ durch Natürliche Killerzellen erhöht sich in Abhängigkeit des Verhältnisses zu Monozyten und ist stärker als die Aktivierung durch synthetische *Toll-like*-Rezeptor-Liganden für *Toll-like*-Rezeptor 7 und 8

NK-Zellen und Monozyten wurden isoliert und kultiviert. Ein Versuchsaufbau wurde gewählt, in dem Monozyten und NK-Zellen in unterschiedlichem Verhältnis zueinander standen (Monozyten zu NK-Zellen: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 und reine NK-Zellen). Anschließend wurde mit isRNA 9.3as, 3M-001 (TLR7-Ligand), 3M-002 (TLR8-Ligand), 3M-003 (TLR7/8-Ligand) sowie Poly(I:C) stimuliert. Die Überstände der Zellkulturen wurden nach 12 und nach 36 Stunden mittels ELISA auf INF- $\gamma$  untersucht (Abbildung 11).

Zum frühen Abnahmezeitpunkt nach 12 Stunden war lediglich isRNA 9.3as im Stande, IFN- $\gamma$  in der Zellkultur zu induzieren, wobei das niedrigste Verhältnis für eine Induktion bei Monozyten zu NK-Zellen 1:4 (25.000 zu 100.000 Zellen) lag und bei ansteigender Zahl von Monozyten zunehmend verstärkt wurde (IFN- $\gamma$  pg/ml; Monozyten zu NK-Zellen 1:4 718  $\pm$ 122, 1:2 2581  $\pm$ 338, 1:1 3784  $\pm$ 120). Keiner der anderen verwendeten TLR-Liganden konnte zu diesem frühen Zeitpunkt IFN- $\gamma$  induzieren, weder bei niedrigen noch bei hohen Verhältnissen von Monozyten zu NK-Zellen.

Analog zu den gezeigten Versuchen wurde durch die Stimulation von reinen NK-Zellen keine Aktivierung detektiert.

Gegenüber dem frühen Abnahmezeitpunkt von 12 Stunden wurde nach 36 Stunden bereits bei einem Verhältnis von Monozyten zu NK-Zellen 1:64 (1562 zu 100.000 Zellen) IFN- $\gamma$  durch isRNA 9.3as induziert. Analog zum frühen Zeitpunkt konnte diese IFN- $\gamma$ -Produktion durch die NK-Zellen mit ansteigender Zahl von Monozyten gesteigert werden (IFN- $\gamma$  pg/ml; Monozyten zu NK-Zellen 1:64 784  $\pm$ 326, 1:32 1408  $\pm$ 600, 1:16 3076  $\pm$ 1029, 1:8 3765  $\pm$ 456, 1:4 4610  $\pm$ 82, 1:2 4773  $\pm$ 53, 1:1 4693  $\pm$ 57). In den beschriebenen Versuchen wurde die IFN- $\gamma$ -Produktion bei einem Verhältnis von Monozyten zu NK-Zellen 1:2 gegenüber 1:1 nicht weiter erhöht.

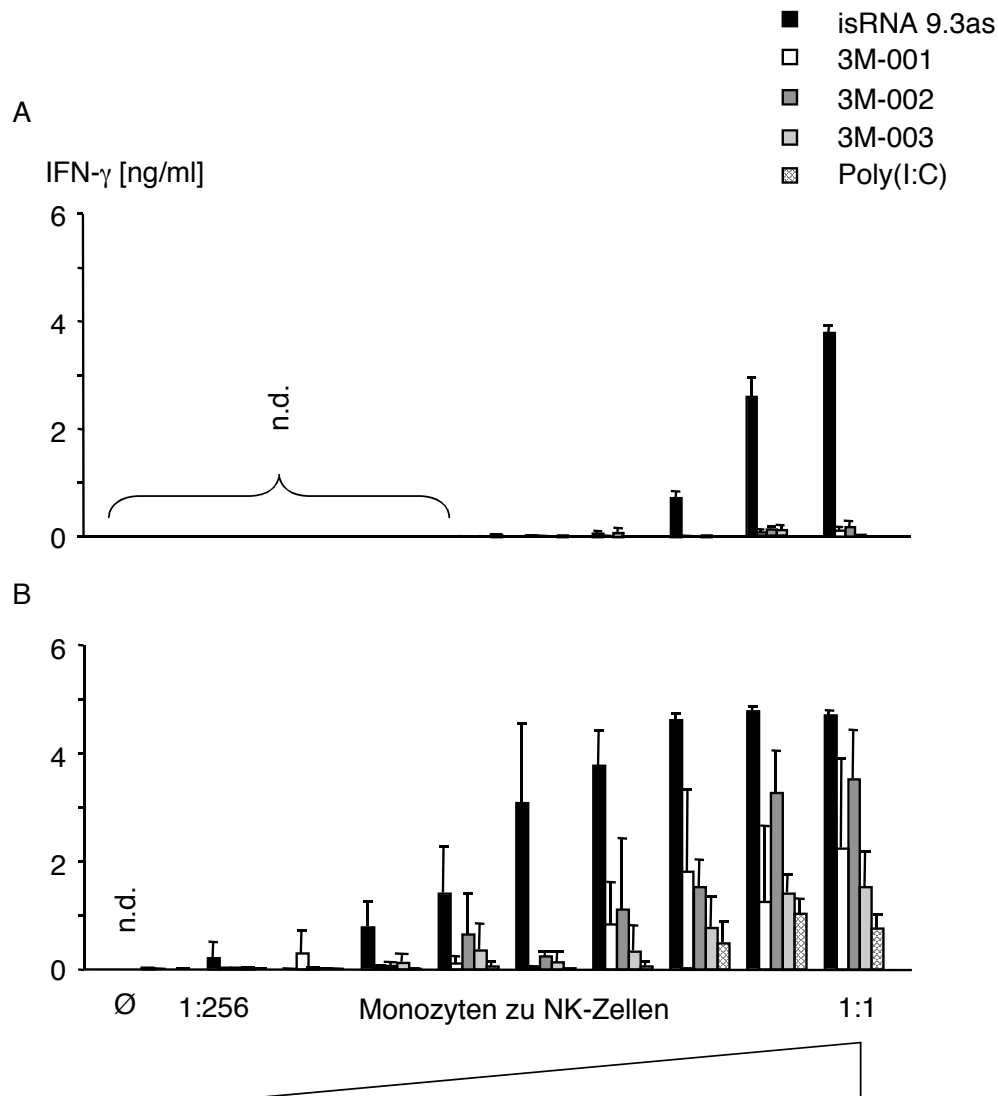
Die TLR-Liganden 3M-001 (TLR7-Ligand), 3M-002 (TLR8-Ligand), 3M-003 (TLR7/8-Ligand) sowie Poly(I:C) induzierten zum frühen Zeitpunkt nach 12 Stunden kein IFN- $\gamma$  in dem gewählten Versuchsaufbau. Die Induktion von IFN- $\gamma$  war demnach gegenüber der durch isRNA 9.3as zeitlich verzögert.

Beim späteren Abnahmezeitpunkt von 36 Stunden waren alle synthetischen TLR-Liganden schwächer in ihrer IFN- $\gamma$ -Induktion als isRNA 9.3as. Die Induktion durch synthetische TLR-Liganden setzte erst bei höheren Konzentrationen von Monozyten gegenüber NK-Zellen ein (geringstes Verhältnis von Monozyten zu NK-Zellen für eine Induktion durch isRNA 9.3as war 1:64, für 3M-002 war es 1:32). Jegliche Induktion war konzentrationsabhängig vom Anteil der akzessorischen Zellen im Versuchsaufbau, keine Induktion war messbar ohne Beteiligung von akzessorischen Zellen. Eine direkte Aktivierung durch die verwendeten synthetischen TLR-Liganden konnte somit, wie bereits für isRNA 9.3as beschrieben, ausgeschlossen werden.

Die synthetischen Agonisten für TLR7 (3M-001), TLR8 (3M-002) und TLR7/8 (3M-003) zeigten eine Induktion von IFN- $\gamma$  erst bei einem gegenüber der isRNA 9.3as höheren Verhältnis von Monozyten zu NK-Zellen. Es wurden jedoch weitaus geringere absolute Werte für IFN- $\gamma$  erkannt.

Poly(I:C) induzierte kein IFN- $\gamma$  nach 12 Stunden und IFN- $\gamma$  nach 36 Stunden bei den Verhältnissen von Monozyten zu NK-Zellen 1:4, 1:2 und 1:1.

Die dargestellten Daten zur IFN- $\gamma$ -Produktion belegten eindeutig, dass isRNA 9.3as ein ausgeprägtes Signal zur Aktivierung der NK-Zellen darstellte. Diese Aktivierung setzte früher ein, war stärker ausgeprägt und es waren weniger akzessorische Zellen für die Aktivierung nötig als im Vergleich mit synthetischen TLR-Liganden 3M-001, 3M-002 und 3M-003.



**Abb. 11 Die Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen erhöht sich in Abhängigkeit des Verhältnisses zu Monozyten**

NK-Zellen und Monozyten wurden aus PBMCs mittels des oben beschriebenen Protokolls isoliert. Der Versuchsaufbau ist im Text beschrieben. Die Kultur wurde mit isRNA 9.3as, 3M-001 (TLR7-Ligand), 3M-002 (TLR8-Ligand), 3M-003 (TLR7/8-Ligand) sowie Poly(I:C) stimuliert. Die Zellkultur fand in 96-Wellplatten bei 100.000 NK-Zellen zu entsprechend weniger Monozyten/Well statt. Die Überstände der Zellkulturen wurden nach 12 (**A**) und nach 36 Stunden (**B**) mittels ELISA auf INF- $\gamma$  untersucht. Die Werte repräsentieren den Mittelwert sowie den SEM von drei Spendern. (n.d. = nicht detektiert)

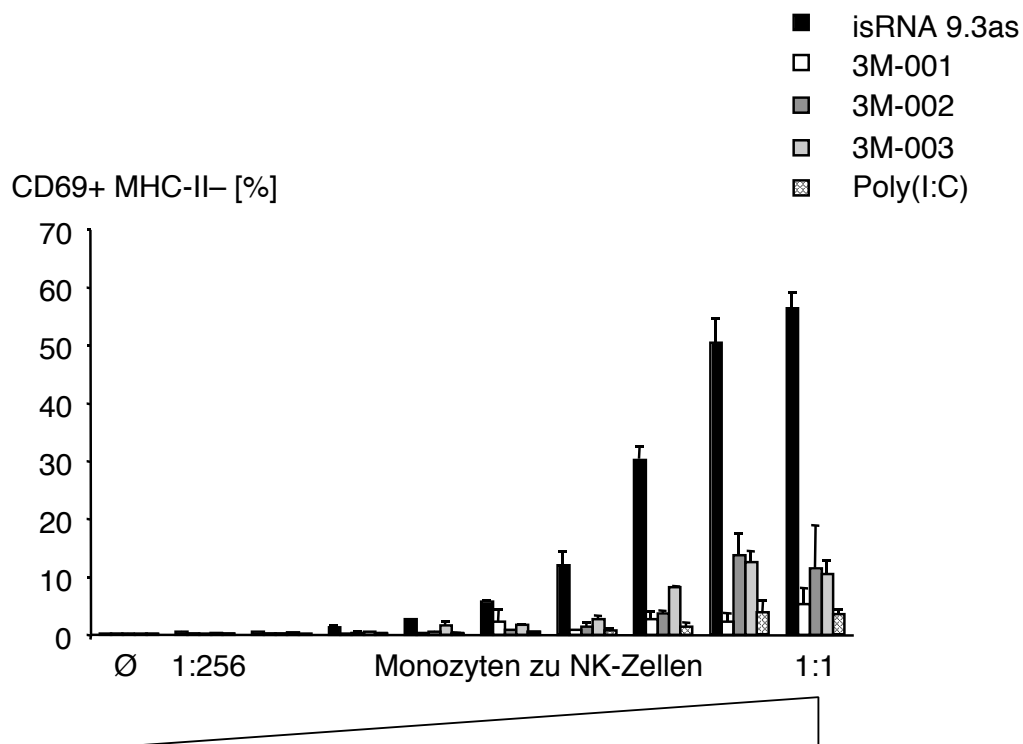
#### 3.2.4.2. Die Expression des Oberflächenmarkers CD69 auf Natürlichen Killerzellen erhöht sich in Abhängigkeit des Verhältnisses zu Monozyten

Neben der beschriebenen Charakterisierung der Induktion von IFN- $\gamma$  wurde zusätzlich die Expression des Oberflächenmarkers CD69 als weiterer Aktivierungsmarker für die Aktivierung der NK-Zellen untersucht (Abbildung 12). CD69 wurde gewählt, da es ein Aktivierungsmarker ist, der sehr sensitiv, aber relativ unspezifisch eine Aktivierung der NK-Zellen anzeigt. Der Versuchsaufbau wurde gleich dem Aufbau für die Untersuchung der IFN- $\gamma$ -Produktion gewählt. Die Zellkulturen wurden nach 36 Stunden mit Anti-CD69-Antikörper sowie Anti-MHC-II-Antikörper gefärbt und mittels FACS-Analyse evaluiert. Beide als akzessorische Zellen verwendete Zellpopulationen (Monozyten und PDCs) tragen auf ihrer Zelloberfläche MHC-II-Moleküle. Durch die Färbung dieser Marker konnten in der FACS-Analyse demnach CD69+ akzessorische Zellen bei der Auswertung ausgeschlossen werden.

NK-Zellen, die mit isRNA 9.3as stimuliert wurden, exprimierten bereits bei einem Verhältnis von Monozyten zu NK-Zellen 1:64 CD69 (1562 zu 100.000 Zellen; dies war dasselbe Verhältnis, bei dem auch IFN- $\gamma$  nach 36 Stunden produziert wurde). Analog zur stärker werdenden IFN- $\gamma$ -Produktion mit ansteigender Menge von Monozyten wurde auch CD69 stärker aufreguliert, wenn mehr akzessorische Zellen an der Interaktion beteiligt waren.

Die Aufregulation von CD69 durch die synthetischen TLR-Liganden fiel gegenüber der Aktivierung durch isRNA 9.3as analog zur beschriebenen IFN- $\gamma$ -Induktion schwächer aus. Der reine Agonist für TLR7 3M-001 führte bei keinem der untersuchten Verhältnissen von Monozyten zu NK-Zellen zu einer Aufregulation von CD69. Das geringste Verhältnis, bei dem ein synthetischer Ligand CD69 aufregulierte, lag bei 1:32 durch Induktion mit 3M-003. Beide, der reine TLR8-Agonist 3M-002 sowie der Agonist für TLR7/8 3M-003 konnten das weitere CD69 aufregulieren, jedoch blieben beide um circa das fünffache gegenüber der Aktivierung durch isRNA 9.3as zurück.

Poly(I:C) induzierte in dem beschriebenen Versuchsaufbau keine Aufregulation von CD69. In der Reinkultur aus NK-Zellen konnte auch nach Stimulation keine Aufregulation des Aktivierungsmarkers nachgewiesen werden.



**Abb. 12 Die Aufregulation des Oberflächenmarkers CD69 auf NK-Zellen erhöht sich in Abhängigkeit des Verhältnisses zu Monozyten**

Ein Versuchsaufbau wurde gewählt, in dem Monozyten und NK-Zellen in unterschiedlichem Verhältnis zueinander standen (Monozyten zu NK-Zellen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 und reine NK-Zellen). Anschließend wurde mit isRNA 9.3as 1 µg/ml, 3M-001, 3M-002, 3M-003 jeweils 10 µM sowie Poly(I:C) 20 µg/ml stimuliert. Die Zellkultur fand in 96-Wellplatten bei 100.000 NK-Zellen zu entsprechend weniger Monozyten/Well statt. Die Zellen wurden nach 36 Stunden mit Antikörpern für CD69 (CD69-PE) und MHC-II (MHC-II-Cy5.5) gefärbt und mittels FACS analysiert. Mittelwerte und SEM von drei Spendern.

### 3.2.5. Plasmazytoide dendritische Zellen führen zu einer Aufregulierung des Oberflächenmarkers CD69, nicht aber zur Produktion von IFN- $\gamma$

Eine Aktivierung von NK-Zellen durch PDCs ist von anderen Autoren für die Stimulation mit CpG-DNA beschrieben worden (Marshall, Heeke et al. 2006). Monozyten sind durch die weiter oben aufgeführten Ergebnisse als akzessorische Zellen für die Aktivierung der NK-Zellen identifiziert worden. Nun sollte zusätzlich untersucht werden, welche Potenz die PDCs nach Stimulation mit isRNA zur Aktivierung von NK-Zellen besitzen.

In einem analogen Versuchsaufbau wie für die Untersuchungen der Interaktion von Monozyten und NK-Zellen wurden die hoch aufgereinigten PDCs mit hoch aufgereinigten NK-Zellen in verschiedenen Verhältnissen zueinander kultiviert und stimuliert.

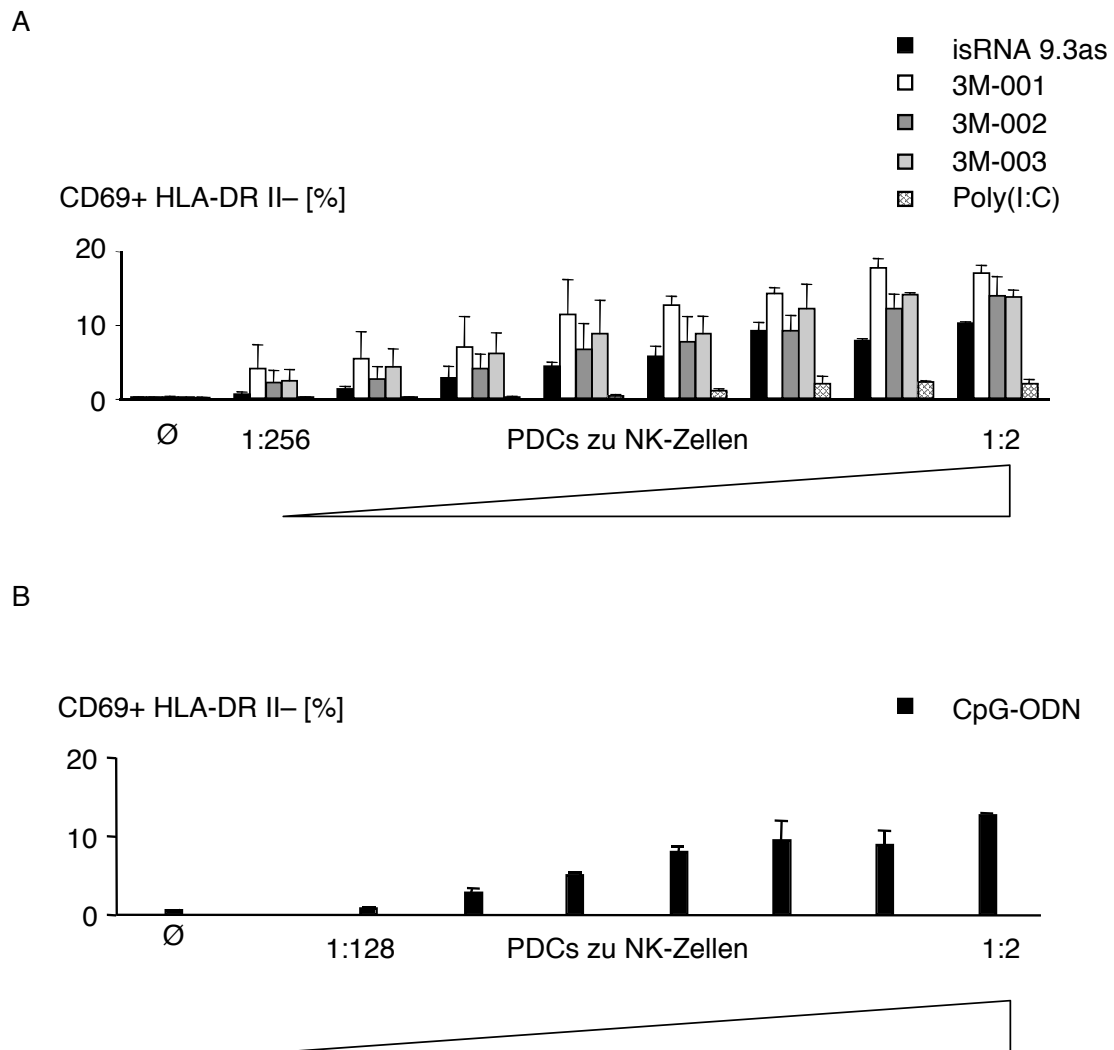
#### 3.2.5.1. Plasmazytoide dendritische Zellen führen nicht zur IFN- $\gamma$ -Induktion

Während Monozyten als akzessorische Zellen in der Kultur mit NK-Zellen nach Stimulation mit isRNA 9.3as in großen Mengen IFN- $\gamma$  induzieren konnten, vermochten PDCs als akzessorische Zellen weder nach 12 noch nach 36 Stunden in NK-Zellen IFN- $\gamma$  induzieren (die Zellen von vier Spendern konnten kein IFN- $\gamma$  produzieren, ein fünfter Spender produzierte geringste Mengen an IFN- $\gamma$ ). Auch keiner der verwendeten synthetischen Liganden 3M-001, 3M-002 und 3M-003 konnte in NK-Zellen IFN- $\gamma$  produzieren. Diese Feststellungen korrelieren zu den weiter oben dargestellten Ergebnissen, welche gezeigt hatten, dass die Depletion von PDCs aus dem Zellverband der PBMCs nach Stimulation mit isRNA keinen signifikanten Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -Produktion hatte. CpG-ODN konnte kein IFN- $\gamma$  innerhalb von PBMCs induzieren (siehe Ergebnisse weiter oben). Analog zu dieser Beobachtung konnte auch die Stimulation in den in diesem Rahmen durchgeführten Experimenten mit hoch aufgereinigten PDCs in Kultur mit NK-Zellen kein IFN- $\gamma$  induzieren (Daten werden nicht gezeigt).

### 3.2.5.2. Immunstimulatorische RNA führt über plasmazytoide dendritische Zellen zur Aufregulation von CD69 auf Natürlichen Killerzellen

Obwohl über die Vermittlung der PDCs als akzessorische Zellen in NK-Zellen weder durch isRNA 9.3as noch durch synthetische TLR-Liganden für TLR7 und TLR8 kein IFN- $\gamma$  induziert werden konnte, kam es durch selbige Stimulation zu einer Aufregulation des Oberflächenmarkers CD69. Anders als für die Aktivierung der NK-Zellen zur CD69-Induktion durch Monozyten waren für die Aktivierung der NK-Zellen durch PDCs die synthetischen TLR-Liganden die stärkeren Aktivatoren. Jedoch bestanden innerhalb der einzelnen TLR-Liganden 3M-001, 3M-002 und 3M-003 keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Aktivierung (Abbildung 13A).

Interessanterweise führte in dem genannten Versuchsaufbau auch die Stimulation mit Poly(I:C) zur Induktion der CD69-Expression. Diese fiel jedoch im Vergleich zu den zur isRNA 9.3as und den synthetischen TLR-Liganden geringer aus. Realisierte Kontrollen mit CpG-ODN 2216 führten zu einer CD69 Aufregulation in der Größenordnung der synthetischen TLR-Liganden 3M-001, 3M-002 und 3M-003 und waren somit in diesem System stärkere Aktivatoren als isRNA 9.3as (Abbildung 13B).



**Abb. 13 isRNA 9.3as induziert vermittelt über PDCs eine Aufregulation von CD69 in NK-Zellen**

Analog zu den Experimenten mit Monozyten wurden PDCs und NK-Zellen kultiviert mit isRNA 9.3as, 3M-001 (TLR7-Ligand), 3M-002 (TLR8-Ligand), 3M-003 (TLR7/8-Ligand) sowie Poly(I:C) stimuliert (**A**). Ein Kontrollexperiment wurde durchgeführt, indem bei selbigem Versuchsaufbau mit CpG-2216 stimuliert wurde (**B**). Angegeben ist der prozentuale Anteil CD69+ HLA-DR-II-Zellen. Die Werte und der SEM wurden aus drei Spendern ermittelt.



### 3.2.6. Die Stimulation mit immunstimulatorischer RNA führt zur Induktion regulatorischer Zytokine

#### 3.2.6.1. Induktion von IFN- $\alpha$

Krug et al. beschrieben in einer Publikation von 2001 eine IFN- $\alpha$ -Induktion durch Typ-A-CpG (CpG-2216) über TLR9 (Krug, Rothenfusser et al. 2001). Hornung et. al. beschrieben 2005 eine IFN- $\alpha$ -Induktion durch dsRNA über TLR7 (Hornung, Guenther-Biller et al. 2005). Die dort getroffenen Aussagen zur IFN- $\alpha$ -Induktion konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Die IFN- $\alpha$ -Induktion durch die genannten Liganden sollte darüber hinaus durch ein entsprechendes Experiment mit der Stimulation durch isRNA 9.3as sowie den synthetischen Liganden für TLR7 und TLR8 verglichen werden.

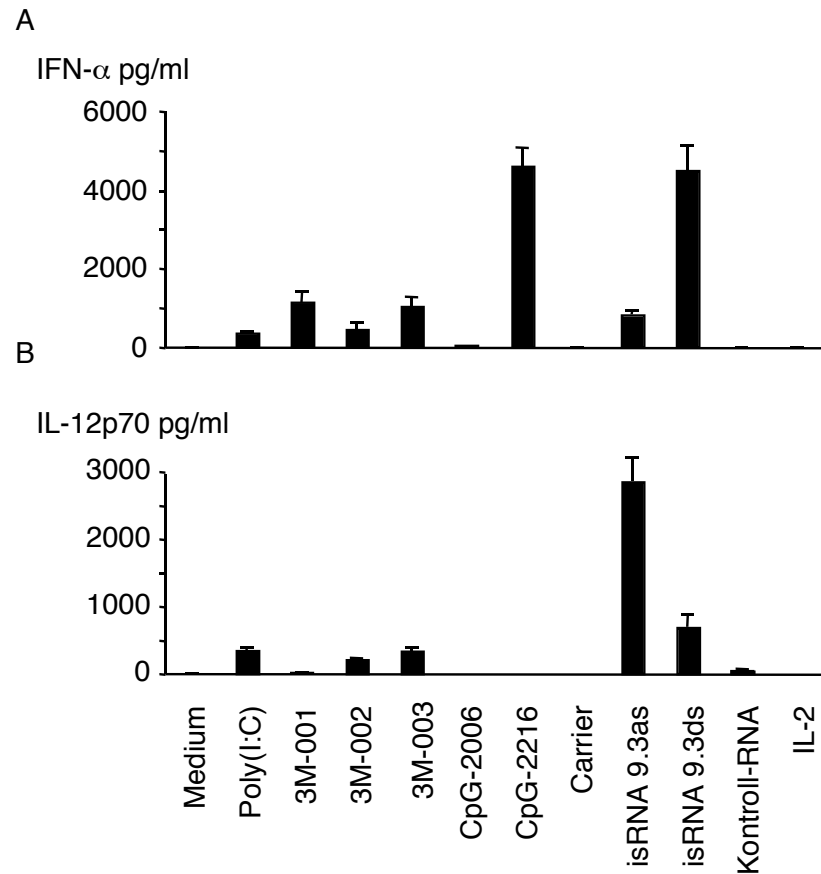
Analog zu den Experimenten zur Messung des IFN- $\gamma$  wurden PBMCs isoliert und stimuliert (Abbildung 14A). Die Liganden Poly(I:C), 3M-001, 3M-002, 3M-003, CpG-2216, und isRNA 9.3 induzierten unter diesen Bedingungen IFN- $\alpha$ . Der TLR9 Agonist CpG-2216 und isRNA 9.3ds induzierten die höchsten Werte. Der synthetische TLR-Ligand 3M-001 sowie 3M-003 induzierten quantitativ viermal weniger IFN- $\alpha$  als isRNA 9.3ds (IFN- $\alpha/\beta$  pg/ml nach Stimulation mit isRNA 9.3ds:  $4500 \pm 624$ ; für 3M-001:  $1145 \pm 256$ ). isRNA 9.3as induzierte doppelt so viel IFN- $\alpha$  wie TLR8-Ligand 3M-002, jedoch im Vergleich zur TLR7-Stimulation durch isRNA 9.3ds und TLR9-Stimulation durch CpG-2216 fünfmal weniger IFN- $\alpha$  (isRNA 9.3ds: Mittelwert  $4500 \pm 624$ ; CpG-2216:  $4593 \pm 475$ ; isRNA 9.3as:  $832 \pm 98$ ). Das für die Zelltransfektion verwendete Carrier-Protein und die aus Adenosinen bestehende nicht-immunstimulatorische RNA-Kontroll-Sequenz induzierten kein IFN- $\alpha$  (untere Detektionsgrenze des ELISA 3,2 pg/ml).

#### 3.2.6.2. Induktion von IL-12p70

Für die kompetente Induktion einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort durch das Immunsystem ist IL-12 ein essentielles Zytokin (Trinchieri 1998; Trinchieri 2003). Die selektive und kontrollierte Induktion dieses Zytokins ist bisher nicht gelungen und wird kontrovers diskutiert (siehe Ausführungen in der Einleitung). Es geht hierbei vor allem um die Induktion der biologisch aktiven Form IL-12p70. CpG-Moleküle induzieren in PBMCs zunächst kein IL-12p70. Eigene Ergebnisse sowie die anderer Arbeitsgruppen aus den vergangenen Jahren wiesen jedoch immer stärker darauf hin, dass neben den

bekannten potentiellen IL-12-produzierenden Zellen, den MDCs auch Monozyten über eine Stimulation von TLR8 zur Produktion von IL-12p70 aktiviert werden können (Bekeredjian-Ding, Roth et al. 2006). Entsprechend und analog zu den Untersuchungen der IFN- $\alpha$ -Induktion wurde das durch eine isRNA hervorgerufene Zytokinmuster für IL-12p70 in PBMCs mit dem anderer TLR-Liganden verglichen (Abbildung 14B).

Während CpG-2216 zu einer robusten Induktion von IFN- $\alpha$  in PBMCs geführt hatte, konnte in derselben Zellpopulation kein IL-12p70 durch diesen Stimulus generiert werden. Robuste Mengen an IL-12p70 wurden dagegen durch die verwendeten isRNAs induziert, wobei sich gegenüber der IFN- $\alpha$ -Induktion durch diese Liganden ein gegensätzliches Bild ergab und die ssRNA viermal mehr IL-12p70 induzierte als die dsRNA (IL-12p70 pg/ml nach Stimulation mit isRNA 9.3as:  $2851 \pm 354$ ; isRNA 9.3ds:  $693 \pm 195$ ). Darüber hinaus wurde IL-12p70 durch solche synthetischen TLR-Liganden induziert, die eine TLR8-stimulierende Komponente aufweisen (3M-002:  $202 \pm 32$ ; 3M-003:  $343 \pm 52$ ).



**Abb. 14** isRNA 9.3as induziert IFN- $\alpha$  und IL-12p70 innerhalb von PBMCs

PBMCs wurden von vier gesunden Spendern gewonnen und mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert. Mittelwerte und SEM von vier Spendern sind gezeigt. Kultur und Stimulation wie oben beschrieben. Die IFN- $\alpha$ - (**A**) und IL-12p70-Messungen (**B**) wurden aus den Überständen der Zellkulturen mittels ELISA nach 36 Stunden Stimulation durchgeführt.

### 3.2.6.3. Monozyten produzieren das IL-12p70 nach Stimulation mit immunstimulatorischer RNA

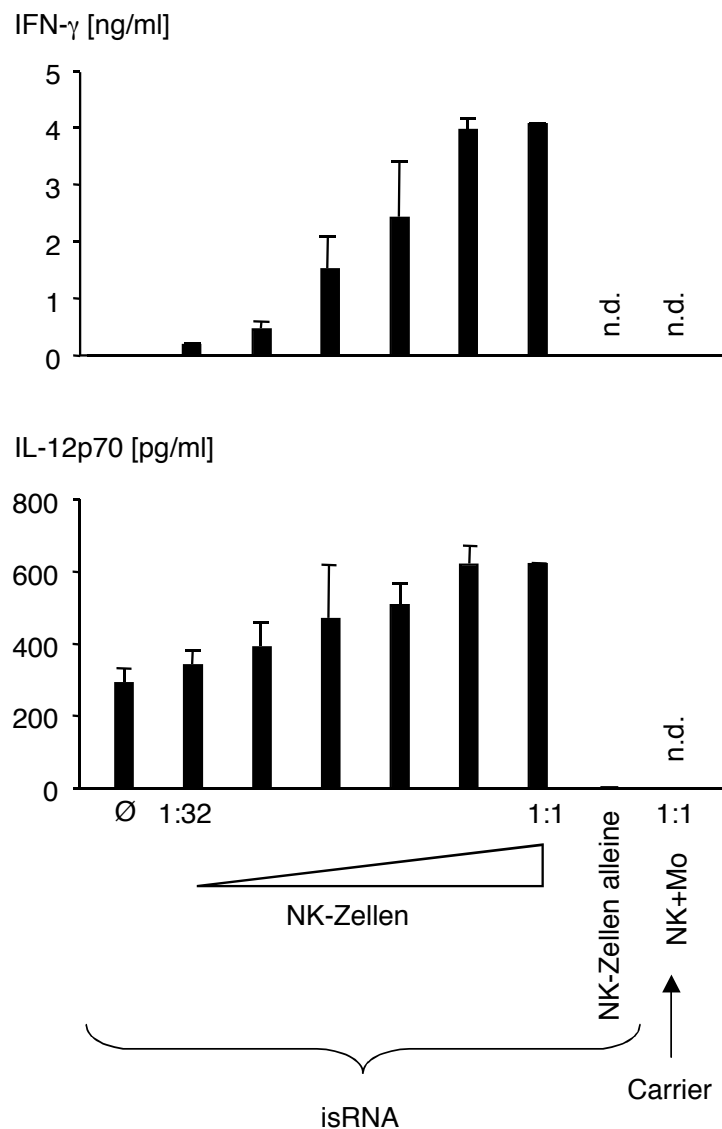
Die beobachtete Induktion von IL-12p70 durch isRNA stellte eine einzigartige Beobachtung dar. Entsprechende Experimente identifizierten Monozyten als die hauptverantwortliche Zellpopulation für die Induktion dieses Zytokins. Monozyten konnten im Zellverband genauso wie als hoch aufgereinigte Zellpopulation durch isRNA zur IL-12p70-Produktion stimuliert werden. Zusätzlich kam es durch isRNA zur TNF- $\alpha$  Synthese in Monozyten. Für die genaue Darstellung dieser Ergebnisse wird auf unveröffentlichte Ergebnisse der Dissertation von Ablasser et al. verwiesen.

### 3.2.7. Die Aktivierung der Effektorzellen und akzessorischen Zellen ist reziprok

Eine gegenseitige und positive Rückkopplung für die Interaktion zwischen DCs und NK-Zellen ist in der Literatur beschrieben (Moretta, Marcenaro et al. 2005). In den oben beschriebenen Ergebnissen wurde eine eindeutige Steigerung sowohl der Aufregulation von CD69 als auch der IFN- $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen in der Interaktion mit Monozyten beschrieben. In den folgenden Versuchen sollte nun ermittelt werden, ob diese Steigerung der Aktivierung reziprok ist, das heißt, ob Monozyten analog ebenfalls stärker aktiviert werden können.

Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden Monozyten unter der Verwendung des beschriebenen modifizierten Protokolls mittels MACS isoliert und in unterschiedlichem Verhältnis mit NK-Zellen kultiviert (NK-Zellen zu Monozyten 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und reine Monozyten). Die Kulturen wurden mit isRNA 9.3as stimuliert und nach 24 Stunden Inkubation IL-12p70 mittels ELISA als Indikator für eine Aktivierung der Monozyten in den Überständen untersucht (Abbildung 15).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigten, dass die IL-12p70-Produktion durch Monozyten in Kultur mit NK-Zellen ca. 2,5-fach so stark war wie durch reine Monozytenkulturen. Dieser Effekt war abhängig von dem Verhältnis zwischen NK-Zellen und Monozyten, da die Basisinduktion von IL-12p70 bei ansteigendem Verhältnis von NK-Zellen konsequent gesteigert wurde (IL-12p70 pg/ml, reine Monozyten  $290 \pm 39$ , NK-Zellen und Monozyten 1:32  $340 \pm 40$ , 1:16  $391 \pm 66$ , 1:8  $468 \pm 148$ , 1:4  $508 \pm 56$ , 1:2  $620 \pm 50$ , 1:1  $621 \pm 0$ ). Es konnte somit eine gegenseitige Aktivierung zwischen Monozyten und NK-Zellen charakterisiert werden.



**Abb. 15 Die Aktivierung zwischen Effektorzellen und akzessorischen Zellen ist reziprok**

Monozyten und NK-Zellen wurden in verschiedenen Verhältnissen kokultiviert (NK-Zellen zu Monozyten 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und reine Monozyten). 24 Stunden nach Stimulation mit isRNA 9.3as  $1\mu\text{g/ml}$  in 96-Wellplatten wurde IL-12p70 im Überstand der Zellkulturen bestimmt. Um zeigen zu können, dass NK-Zellen nach Stimulation mit isRNA 9.3as kein IL-12p70 produzieren, wurden zusätzlich reine NK-Zellen stimuliert. Kontakt zwischen den beiden Zellpopulationen ohne Stimulation führte zu keiner IL-12p70-Induktion. Monozyten in Kultur mit NK-Zellen bei einem Verhältnis 1:1 und Stimulation mit einer RNA-Kontrollsequenz führten ebenfalls zu keiner IL-12p70-Induktion (Daten letzterer Aussage ist nicht gezeigt). Mo = Monozyten, NK = NK-Zellen, n.d. = nicht detektiert

### 3.3. Mechanismen der Effektorzellaktivierung

#### 3.3.1. Nur lösliche Faktoren im Überstand der akzessorischen Zellen sind für die Aktivierung der Effektorzellen verantwortlich

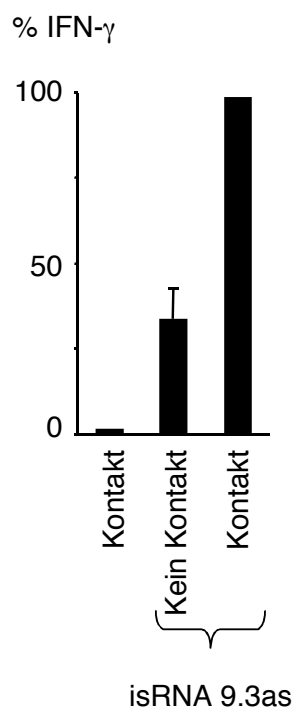
In den vorherigen Ergebnissen konnte eine indirekte Aktivierung der NK-Zellen durch Monozyten beschrieben werden. Zusätzlich wurde erkenntlich, dass die Aktivierung der NK-Zellen bei zunehmendem Verhältnis von Monozyten gegenüber NK-Zellen und daraus resultierender höherer IL-12p70-Produktion weiter gesteigert wurde. Die initialen Untersuchungen zur Interferon-Induktion hatten gezeigt, dass IFN- $\gamma$  innerhalb von PBMCs nur in Korrelation von IL-12p70 gefunden wurde. Diese Ergebnisse legten nahe, dass lösliche Faktoren wie IL-12p70 eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen durch isRNA 9.3as spielten.

Es sollte nun genau untersucht werden, inwieweit lösliche Faktoren tatsächlich für diese Effekte verantwortlich sind und ob zusätzlich ein Zell-Zellkontakt ausschlaggebend für eine Aktivierung ist. Diese Fragestellung konnte durch eine Reihe von Experimenten beantwortet werden, in dem jeweils eine Konstellation hergestellt wurde, in der entweder lösliche Faktoren oder Zell-Zellkontakt für eine mögliche Aktivierung ausschlaggebend waren.

##### 3.3.1.1. Lösliche Faktoren alleine sind ausreichend für die Produktion von IFN- $\gamma$

Zunächst wurde untersucht, ob die löslichen Faktoren, die durch Monozyten nach Stimulation mit isRNA 9.3as sezerniert werden, ohne weiteren Zell-Zellkontakt zu einer Aktivierung der NK-Zellen führen. Als Aktivierungsmarker wurde wiederum die Induktion von IFN- $\gamma$  verwendet, das nach 36 Stunden in den Überständen der Kultur mittels ELISA detektiert wurde. Durch die Verwendung eines Membransystems mit einer Porengröße von  $0,2\mu\text{m}$ , das die beiden Zellpopulationen in der Kultur voneinander trennte, konnte ein Zell-Zellkontakt in einer der untersuchten Bedingungen verhindert werden. Lösliche Faktoren konnten die Membran in beide Richtungen durch die Poren passieren.

Nach Stimulation mit isRNA 9.3as kam es zu einer deutlichen Induktion von IFN- $\gamma$ . Diese Aktivierung konnte jedoch durch zusätzlichen Zell-Zellkontakt um über das Doppelte gesteigert werden (Abbildung 16).



**Abb. 16      Lösliche Faktoren alleine sind ausreichend für die Produktion von IFN- $\gamma$**

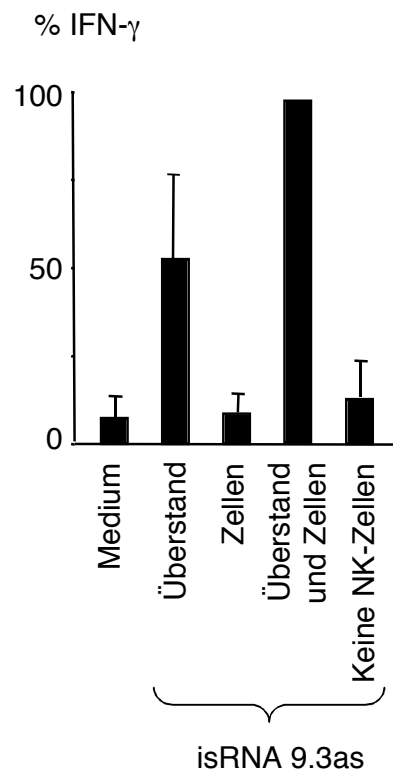
Monozyten und NK-Zellen wurden in einer 96-Wellplatte zu jeweils 100.000/Well kokultiviert und mit isRNA 9.3as stimuliert. In einer Bedingung wurden die beiden Zellpopulationen durch eine semipermeable Membran mit einer Porengröße von  $0,2\mu\text{m}$  voneinander getrennt und hatten keinen Zell-Zellkontakt. IFN- $\gamma$  wurde im Überstand der Kulturen 36 Stunden nach Stimulation mittels ELISA bestimmt. Die IFN- $\gamma$ -Induktion der einzelnen Bedingungen sind relativ zueinander dargestellt. Drei Spender wurden analysiert.

### 3.3.1.2. Zell-Kontakt alleine führt nicht zur IFN- $\gamma$ -Produktion in Natürlichen Killerzellen

Um eine Situation herzustellen, in der lediglich ein Zell-Zellkontakt für die Aktivierung und die Produktion von IFN- $\gamma$  verantwortlich sein würde, wurden Monozyten zunächst über einen Zeitraum von 24 Stunden mit isRNA 9.3as stimuliert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und so alle löslichen Faktoren entfernt. Die gewaschenen Monozyten wurden jetzt mit NK-Zellen in Kultur gegeben. Eine resultierende Aktivierung würde somit lediglich auf einen interzellulären Kontakt zurückzuführen sein. In einer Kontrolle wurden die den Monozyten entnommenen Überstände als Stimulus verwendet.

Während die Überstände der stimulierten Monozyten alleine ausreichend für eine IFN- $\gamma$ -Induktion waren (analog zu den Ergebnissen oben), induzierte ein Zell-Zellkontakt alleine keine IFN- $\gamma$ . Ebenfalls analog zu den oben beschriebenen Ergebnissen konnte aber der interzelluläre Kontakt die durch lösliche Faktoren hervorgerufene Induktion von IFN- $\gamma$  verstärken (Abbildung 17).





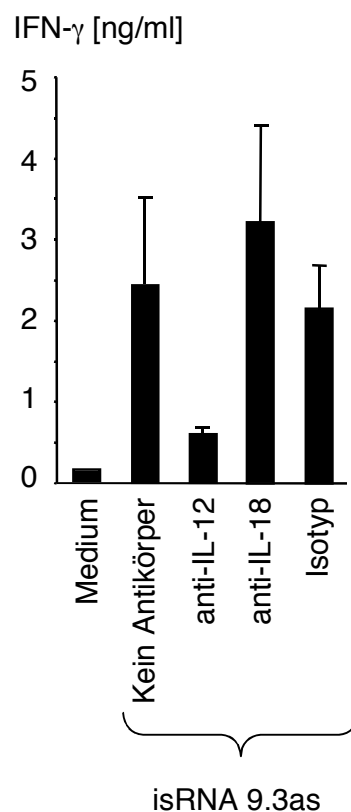
**Abb. 17      Kontakt alleine induziert kein IFN- $\gamma$  in NK-Zellen**

Monozyten wurden zunächst über einen Zeitraum von 24 Stunden mit isRNA 9.3as 1  $\mu$ g/ml in einer 96-Wellplatte zu 100.000/Well stimuliert. Anschließend wurden bei einigen der Kulturen die Überstände abgenommen und die Zellen gewaschen. Aufgereinigte NK-Zellen wurden mit dem Überstand der stimulierten Monozyten (repräsentiert lösliche Faktoren), den gewaschenen Zellen (repräsentiert Zell-Zellkontakt) oder beidem zusammen in einer 96-Wellplatte kultiviert. IFN- $\gamma$  wurde als Aktivierungsmarker herangezogen und nach 36 Stunden im Überstand gemessen. Die IFN- $\gamma$ -Induktion der einzelnen Bedingungen sind relativ zueinander dargestellt. Mittelwerte und SEM dreier Spender sind gezeigt.

### 3.3.2. IL-12p70 ist notwendig für die RNA-abhängige Aktivierung von Natürlichen Killerzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass lösliche Faktoren in dem verwendeten System für eine Aktivierung der NK-Zellen essentiell sind, lag die Annahme nahe, dass IL-12p70 einen zentralen Einfluss bei dieser Aktivierung besitzt. Schließlich war IFN- $\gamma$  in den Experimenten zur Identifizierung des Zytokinprofils in PBMCs nur in Korrelation mit IL-12p70 beobachtet worden. Darüber hinaus ist IL-12 neben IL-18 in der Literatur als ein Zytokin beschrieben, das für eine IFN- $\gamma$ -Induktion entscheidend ist (Trinchieri 1993; Trinchieri 1995; Gorski, Waller et al. 2006). Ob das jedoch auch für die Aktivierung durch TLR-stimulierende RNA der Fall ist, war bisher ungeklärt. Diese Fragestellung sollte durch ein gezieltes und aussagekräftiges Blocking-Experiment beantwortet werden.

PBMCs wurden mit isRNA 9.3as stimuliert und ein Anti-IL-12-Antikörper sowie ein Anti-IL-18-Antikörper zur jeweiligen Antikörperblockade wurden zugegeben (Abbildung 18). Die Überstände der Zellkulturen wurden nach 36 Stunden auf IFN- $\gamma$  untersucht. Während die Verwendung des Anti-IL-18-Antikörpers keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Isotypkontrolle aufwies, führte die Verwendung des Anti-IL-12-Antikörpers zu einer hoch signifikanten Reduktion der IFN- $\gamma$ -Produktion. Die Kombination aus beiden Antikörpern zeigte keine weitere Reduktion gegenüber der alleinigen Blockade durch den Anti-IL-12-Antikörper (letztere Daten werden nicht gezeigt).



**Abb. 18 Inhibition von IL-12p70 identifiziert dieses Zytokin als essentiell für Aktivierung der NK-Zellen**

PBMCs wurden in einer 96-Wellplatte bei 400.000/Well kultiviert und mit isRNA 9.3as 1  $\mu$ g/ml stimuliert. Anti-IL-12- und Anti-IL-18-Antikörper wurden zu 1,25  $\mu$ g/ml entweder separat oder in Kombination (nicht gezeigt) zugegeben. Eine Bedingung enthielt eine Isotyp-Kontrolle. Nach 36 Stunden wurde IFN- $\gamma$  im Überstand gemessen. Die Werte und SEM von vier Spendern sind gezeigt.

### 3.4. Induktion von Zytotoxizität

#### 3.4.1. Die Stimulation mit immunstimulatorischer RNA steigert die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen gegenüber Tumorzellen

NK-Zellen besitzen die Fähigkeit, zwischen normalen und Virus-infizierten oder malignen Zellen zu unterscheiden (Moretta, Bottino et al. 1996; Long 1999; Lopez-Botet, Llano et al. 2000; Vilches and Parham 2002). Mehrere Publikationen haben darauf verwiesen, dass TLR-Liganden für TLR7 und TLR8 zu einer gesteigerten lytischen Aktivität von humanen PBMCs führen (Hart, Athie-Morales et al. 2005; Gorski, Waller et al. 2006). Um den Einfluss der untersuchten isRNAs auf die lytische Aktivität von PBMCs zu untersuchen, wurde ein  $^{51}\text{Chrom}$ -Lyse-Assay herangezogen, in dem Daudi-Zellen als  $^{51}\text{Chrom}$ -markierte Zielzellen eingesetzt wurden. Die induzierte lytische Aktivität wurde mit der durch IL-2, Poly(I:C), 3M-001, 3M-002, 3M-003, CpG-2216, CpG-2006 sowie einer Kontroll-RNA induzierten Zytotoxizität verglichen.

Eine signifikante Steigerung der zytotoxischen Aktivität gegenüber Daudi-Zellen wurde für Poly(I:C), 3M-001, 3M-002, 3M-003, CpG-2216, CpG-2006, isRNA 9.3as und für die Positivkontrolle IL-2 erreicht. Die Kontroll-RNA genauso wie das zur Transfektion verwendete Carrier-Protein alleine erzielten eine zytotoxische Aktivität gleich einer Kontrolle ohne Stimulation. (Prozent Lyse; Kontroll-RNA:  $18,9 \pm 2$ , E:T = 10:1;  $12,9 \pm 2$ , E:T = 5:1;  $5,4 \pm 3$ , E:T = 2,5:1;  $3,5 \pm 1$ , E:T = 1,25:1; Carrier-Protein:  $22,9 \pm 4$ , E:T = 10:1;  $14,0 \pm 3$ , E:T = 5:1;  $4,8 \pm 2$ , E:T = 2,5:1;  $1,1 \pm 1$ , E:T = 1,25:1; die Werte der Medium-Kontrolle können aus der Abbildung 19 entnommen werden, eine Hintergrundaktivität von 20,9% für E:T = 10:1 wurde für die weitere Analyse aus den Werten für die Kontroll-RNA, dem Carrier-Protein und der Medium-Kontrolle berechnet).

Der Vergleich der zytotoxischen Aktivität der einzelnen Liganden untereinander ergab, dass isRNA 9.3as PBMCs signifikant stärker ( $P < 0,05$ ) zytotoxische Aktivität induziert (30,9% über dem Hintergrund) als die TLR9-Stimulation mit CpG-2006 und CpG-2216 (entsprechend 13% und 24,4% über dem Hintergrund, für E:T 10:1).

Darüber hinaus übertraf die zytotoxische Aktivität hervorgerufen durch isRNA 9.3as die TLR7-Liganden 3M-001 und TLR8-Liganden 3M-002 (21,3% und 23,3% über dem Hintergrund, für E:T 10:1) und war ebenso hoch wie die zytotoxische Aktivität hervorgerufen durch TLR7/8-Ligand 3M-003 (29,1% über dem Hintergrund, für E:T 10:1). Beide isRNA 9.3as und isRNA 9.3ds erzielten Werte in derselben

Größenordnung wie der bereits bekannte NK-Zellen-Aktivator Poly(I:C) (29,2% über dem Hintergrund, für E:T 10:1). Keine Unterschiede wurden zwischen der Verwendung des Einzelstrangs und des Doppelstrangs der isRNA 9.3 als Aktivator der zytotoxischen Aktivität beobachtet. Hohe Dosen von IL-2 (2000U/ml) wurden als Positivkontrolle verwendet (35,1% über dem Hintergrund, für E:T = 10:1).

Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass isRNA 9.3 als Doppelstrang und als Einzelstrang zusätzlich zur IFN- $\gamma$ -Sekretion und zur Aufregulation von CD69 einen starken, Sequenz-spezifischen Stimulus für die Steigerung der Zytotoxizität von NK-Zellen darstellte.

Spender	E:T	Prozent Lyse Daudi					
		Medium	Carrier	Kontroll-RNA	isRNA 9.3ds	Poly(I:C)	IL-2
1	10,0:1	29,8	24,4	21,7	55,6	57,5	63,3
	5,0:1	19,4	18,0	18,1	39,4	47,9	41,0
	2,5:1	0,1	11,3	13,4	29,4	29,3	26,2
	1,25:1	0,0	6,4	6,5	16,7	5,1	18,2
2	10,0:1	27,9	19,6	18,8	58,3	56,7	60,5
	5,0:1	17,7	11,2	11,3	38,1	43,1	45,6
	2,5:1	7,7	11,1	3,5	28,5	34,7	34,4
	1,25:1	0,0	10,0	3,5	16,2	22,7	24,5
3	10,0:1	15,5	14,8	13,5	41,2	38,1	57,2
	5,0:1	7,8	9,9	8,7	25,5	26,6	32,7
	2,5:1	4,3	7,7	1,4	10,1	3,3	19,7
	1,25:1	1,6	12,1	1,4	5,8	6,4	12,3
4	10,0:1	18,2	16,7	21,6	45,3	48,3	43,1
	5,0:1	11,3	9,3	13,6	34,0	43,8	28,9
	2,5:1	7,0	5,9	3,3	17,9	27,9	19,8
	1,25:1	3,1	9,3	2,8	10,5	11,2	14,0
<b>Mittel (SEM)</b>	10,0:1	22,9 (±3,5)	18,9 (±2)	18,9 (±2)	50,1 (±4)	50,1 (±5)	56,0 (±5)
	5,0:1	14,0 (±2,7)	12,1 (±2)	12,9 (±2)	34,3 (±3)	40,3 (±5)	37,1 (±4)
	2,5:1	4,8 (±1,7)	9,0 (±1)	5,4 (±3)	21,3 (±5)	23,8 (±7)	25,0 (±4)
	1,25:1	1,1 (±0,8)	9,5 (±1)	3,5 (±1)	12,3 (±3)	11,3 (±4)	17,3 (±3)

Spender	E:T	Prozent Lyse Daudi					
		CpG-2006	CpG-2216	3M-001	3M-002	3M-003	isRNA 9.3as
1	10,0:1	44,4	58,0	47,4	49,1	52,8	60,7
	5,0:1	33,8	41,5	30,8	36,4	47,5	46,1
	2,5:1	21,0	30,7	25,8	24,6	28,2	32,9
	1,25:1	7,4	5,3	12,4	19,6	14,3	18,7
2	10,0:1	45,1	56,5	50,1	48,1	58,5	52,6
	5,0:1	29,3	41,8	33,6	31,6	44,8	34,9
	2,5:1	25,5	33,8	27,6	34,4	29,2	31,1
	1,25:1	11,3	19,3	24,5	19,8	14,0	17,9
3	10,0:1	22,4	30,4	31,6	39,0	43,4	43,8
	5,0:1	10,2	18,4	25,6	21,4	29,9	27,1
	2,5:1	4,5	21,6	9,2	13,5	16,5	12,3
	1,25:1	1,4	9,8	8,1	13,0	6,3	6,0
4	10,0:1	23,8	36,2	39,7	40,5	45,1	50,1
	5,0:1	11,6	24,4	27,2	29,3	32,0	31,7
	2,5:1	6,9	17,1	18,0	24,3	23,6	21,5
	1,25:1	3,4	12,1	10,6	14,4	8,7	9,7
<b>Mittel (SEM)</b>	10,0:1	33,9 (±6)	45,3 (±7)	42,2 (±4)	44,2 (±3)	50,0 (±4)	51,8 (±4)
	5,0:1	21,2 (±6)	31,5 (±6)	29,3 (±2)	29,7 (±3)	38,5 (±4)	34,9 (±4)
	2,5:1	14,5 (±5)	25,8 (±4)	20,2 (±4)	24,2 (±4)	24,4 (±3)	24,4 (±5)
	1,25:1	5,9 (±2)	11,6 (±3)	13,9 (±4)	16,7 (±2)	10,8 (±2)	13,1 (±3)

**Abb. 19 Die Stimulation mit isRNA steigert die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen**

PBMCs wurden mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert (Poly(I:C) 20 µg/ml, 3M-001, 3M-002, 3M-003 jeweils 10 µM, CpG-2216 und CpG-2006 jeweils 3 µg/ml, isRNA 9.3as und isRNA 9.3ds 1 µg/ml sowie das zur Transfektion verwendete Carrier-Protein, einer Kontroll-RNA in gleicher Konzentration wie die isRNA sowie IL-2 2000U/ml). Die stimulierten PBMCs wurden nach 36 Stunden in entsprechenden Konzentrationen mit <sup>51</sup>Chrom-markierte Daudi-Zellen kultiviert und über Nacht inkubiert und jeweils die prozentuale Daudi-Lyse ermittelt. Werte für vier Spender sind gezeigt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Übersicht über die experimentellen Befunde

Ausgangsbefund dieser Arbeit war die Beobachtung, dass PBMCs nach Stimulation mit isRNA robuste Mengen an IFN- $\gamma$  produzieren. IFN- $\gamma$  besitzt direkte Abwehrfunktionen und repräsentiert eine T<sub>H</sub>1-gerichtete Immunantwort. Die kontrollierte und selektive Induktion einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunantwort mit Produktion von IFN- $\gamma$  über die Stimulation von TLRs unterstützt zwei entscheidende Funktionen der Immunreaktion. Zum einen erhöht sie die immunologische Abwehr gegen Tumorzellen und virale Infektionen, zum anderen wirkt sie allergischen Reaktionen entgegen, die auf dem *Switch* einer T<sub>H</sub>1- zu einer T<sub>H</sub>2-gerichteten Immunlage basieren. Diese Beobachtungen machen isRNA zu einem interessanten Stimulus für eine Immuntherapie und als Immunadjuvans.

In den weiterführenden Experimenten wurde klar, dass Immuneffektorzellen wie NK-Zellen und T-Zellen verantwortlich für die Induktion des IFN- $\gamma$  waren. Interessant war die Beobachtung, dass eine Induktion zur Zytokinproduktion durch die Effektorzellen des Immunsystems nicht auf direktem Wege erfolgen konnte, sondern von der Hilfe akzessorischer Zellen abhängig war. Als potenzielle akzessorische Zellen konnten Monozyten, PDCs und MDCs identifiziert werden.

Der indirekte Aktivierungsweg der NK-Zellen zur INF- $\gamma$ -Produktion konnte durch die Untersuchungen zur Verteilung der verschiedenen TLRs auf den beteiligten Zellen erklärt werden. NK-Zellen exprimierten unseren Ergebnissen zufolge lediglich mRNA für TLR3, jedoch keine mRNA für TLR7, TLR8 und TLR9. Messungen der mRNA Expression für die TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 mittels *Real-time*-PCR ergaben, dass sich das Expressionsmuster auf NK-Zellen weder nach Vorstimulation durch IL-2 und IFN- $\gamma$  noch nach direkter Stimulation mit isRNA veränderte. Auch blieb das Expressionsmuster von NK-Zellen nach Stimulation mit isRNA in der Anwesenheit von Monozyten unbeeinflusst.

Noch eindrucksvoller konnte die Abhängigkeit der Aktivierung von akzessorischen Zellen durch die experimentellen Untersuchungen im murinen System unterstrichen werden. Die Aktivierung von NK-Zellen im murinen System war gänzlich abhängig von TLR7 auf akzessorischen Zellen, nicht jedoch von TLR7 auf NK-Zellen.

Sowohl Monozyten als auch PDCs konnten die Funktion der akzessorischen Zellen erfüllen, wenn auch die Monozyten in ihrer Rolle als akzessorische Zellen zu einer schnelleren und weitaus stärkeren Aktivierung führten. Darüber hinaus war die Art des Stimulus für das Ausmaß der Aktivierung entscheidend, wobei für die Aktivierung von Monozyten mit isRNA anderen TLR-Liganden überlegen war.

Die weitere Analyse induzierter Zytokine in PBMCs hatte gezeigt, dass diese Zellen im Verband nach Stimulation mit isRNA IFN- $\alpha$  und IL-12p70 produzierten. Beide Zytokine besitzen regulatorische Funktionen bei der Generierung einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunantwort. Es war weiter zu beobachten, dass die als akzessorische Zellen identifizierten Zellen Monozyten und PDCs für die Produktion dieser Zytokine verantwortlich waren. Beide Monozyten und PDCs konnten direkt durch isRNA zur Zytokinproduktion aktiviert werden, und zwar die PDCs zur Produktion von IFN- $\alpha$  und die Monozyten zur Produktion von IL-12p70.

Für die zellvermittelte, indirekte Aktivierung der Effektorzellen konnte gezeigt werden, dass lösliche Faktoren die Aktivierung erzeugten und diese durch Zell-Zellkontakt verstärkt wurde. Innerhalb der löslichen Faktoren wurde IL-12p70 als essentielles Zytokin für die Aktivierung der NK-Zellen identifiziert, IL-18 hatte keinen erkennbaren Einfluss. Darüber hinaus verstärkte sich dosisabhängig die Aktivierung der akzessorischen Zellen durch die Interaktion mit NK-Zellen, die zuvor mit isRNA aktiviert worden waren. Dies zeigt, dass die Aktivierung reziprok erfolgte.

Unsere Experimente zeigten zusätzlich, dass die Aktivierung der Effektorzellen zu einer tatsächlich höheren lytischen Aktivität gegenüber als *Fremd* erkannten Strukturen führte. Die Zytotoxizität gegenüber an MHC-I veränderten, malignen Zellen lag in derselben Größenordnung wie der bekannte Zytotoxizitäts-Induktor Poly(I:C) und die gemeinsame Stimulation von TLR7/8 durch 3M-003. Die durch isRNA erreichte Zytotoxizität war ausgeprägter als die selektive Stimulation von TLR7 durch 3M-001, TLR8 durch 3M-002 oder von TLR9 durch CpG-ODNs.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass isRNA einen sehr spezifischen und gleichzeitig äußerst potenten Stimulus des Immunsystems *in vitro* darstellt. isRNAs werden von PDCs über TLR7 und Monozyten über TLR8 erkannt. Dies führt zur Induktion der regulatorischen Zytokine IL-12p70 und IFN- $\alpha$ , in deren Folge kommt es zur indirekten Aktivierung von NK-Zellen, charakterisiert durch erhöhte Zytotoxizität und einer robusten IFN- $\gamma$  Sekretion. Diese selektive und potente Induktion einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunantwort birgt therapeutisches Potenzial bei der Behandlung von Tumoren und viralen Infektionen.



## 4.2. Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

### 4.2.1. Die Erkennung von RNA durch das Immunsystem

Die Erkennung von viralen Strukturen durch den menschlichen Organismus bleibt trotz des raschen Erkenntniszuwachses der letzten Jahre ein noch nicht gänzlich verstandenes Teilgebiet der Immunologie. Die Hypothesen und Erkenntnisse zu den zahlreichen Erkennungsmechanismen, welche Immunzellen und Nicht-Immunzellen zur Identifizierung viraler Nukleinsäuren aufweisen können, sind in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich beschrieben worden. Die Ergebnisse aus der Literatur sowie eigene Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verschiedenen Populationen innerhalb der Immunzellen jeweils über ein individuelles Profil von Mechanismen zur Erkennung von Viren verfügen. Dieser Ansicht zufolge werden verschiedene virale Infektionen zell-spezifisch detektiert und können so eine der drohenden viralen Infektion angepasste, spezifische Immunantwort in Gang setzen. Welche Eigenschaften jedoch virale Strukturen aufweisen müssen, um durch den einen oder den anderen Mechanismus oder überhaupt vom Immunsystem erkannt zu werden, ist bisher nur in Ansätzen verstanden.

Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene Prinzipien der Nukleinsäuredetektion skizzieren, die einerseits auf Lokalisation, andererseits auf strukturellen Unterschieden der Nukleinsäure basieren. Eine mögliche Beschaffenheit viraler Strukturen, die zu einer Erkennung durch das Immunsystem führen, ist die Expression spezifischer Sequenzen, die unter Viren stark konserviert sind und nicht oder nur in stark vermindertem Ausmaß im menschlichen Genom vorkommen. Eine virale RNA könnte so durch das Immunsystem als *Fremd* erkannt werden, die eigenen RNAs der Zelle würden zu keiner Erkennung führen.

Eine Rezeptorfamilie, die in diesem Detektionsprozess eine zentrale Rolle einnimmt, ist die Familie der TLRs. Prominente Vertreter dieser Proteinklasse sind die beschriebenen TLR3, TLR7 und TLR8. Diese Rezeptoren sind im endosomalen Kompartiment der Zellen lokalisiert, und zwar TLR7 in PDCs und TLR8 in Monozyten. Kommt es im Endosom zur Akkumulation von ssRNA oder kurzer dsRNA, so wird eine starke Zytokin-Antwort in diesen Zellpopulationen induziert. Voraussetzung für die Fremderkennung ist hierbei hauptsächlich die Kompartimentalisierung der RNA im Endosom der Zelle. Einige mikrobielle Pathogene versuchen gezielt, durch ein Entschwinden in das Zytosol endosomalen Erkennungsmechanismen der Zelle zu entkommen (Andrews and Webster 1991).

Neben diesem primär lokalisationsabhängigen Mechanismus der RNA-Erkennung gibt es weitere Mechanismen der Viruserkennung, die sich insbesondere auf Detektion von langer dsRNA spezialisiert haben. Lange dsRNA entsteht obligat bei der Replikation von Negativ-Strang-RNA-Viren und fakultativ bei der Transkription zahlreicher Viren. In diesem Zusammenhang scheint einer kürzlich beschriebenen Klasse von zytosolischen Proteinen eine große Bedeutung zuzukommen, deren am Besten charakterisierter Vertreter das RIG-I ist. Über seine dsRNA-Bindungsdomäne erkennt RIG-I virale dsRNA. Die durch die CARD-Domäne vermittelte Signaltransduktion führt dann zur Induktion von Interferon.

#### 4.2.2. Gezielte Immunstimulation durch RNA über *Toll-like*-Rezeptor 7 und 8

Unseren Ergebnissen zufolge wird isRNA durch TLR7 und TLR8 erkannt. Im humanen System konnte jedoch keine Unterscheidung in der Erkennung durch diese beiden Rezeptoren erfasst werden. Die Tatsache, dass Monozyten auf ssRNA mit der Produktion von IL-12p70 und PDCs mit IFN- $\alpha$  reagieren, legt eine Beteiligung von TLR8 bzw. TLR7 nahe. Da jedoch diese beiden Rezeptoren im humanen System exklusiv auf diesen Zellen exprimiert werden, kann keine allgemeine Zuordnung von TLR8 zur IL-12-Produktion und TLR7 zur IFN- $\alpha$ -Produktion getroffen werden. Es liegt eher nahe, dass das Zytokinprofil durch den Zelltyp bestimmt wird, der den entsprechenden Rezeptor exprimiert. Im murinen System bestätigt sich diese Vermutung, da hier auch myeloide Zellen TLR7 exprimieren, wobei TLR8 unter den gegebenen Umständen nicht funktional ist. TLR7-Stimulation führt jedoch in murinen myeloiden Zellen genauso zur IL-12-Produktion wie TLR8 Stimulation in humanen Monozyten. Im murinen System gelang auch durch die Verwendung von TLR7-defizienten Zellen eine eindeutige Zuordnung der RNA-sensitiven Zellen zu der myeloiden Zellpopulation. Letztlich kann man somit zusammenfassen, dass RNA-abhängige Stimulation von TLR7 bzw. TLR8 in myeloiden Zellen zu einer IL-12-Produktion führt, wobei TLR7 Aktivierung in PDCs eine IFN- $\alpha$ -Produktion induziert.

Für die gezielte Immunstimulation durch RNA-Oligonukleotide sind drei Merkmale von entscheidender Bedeutung: Die verwendete Sequenz, die Struktur der isRNA und das *Delivery* der fragilen RNA ins Innere einer Zelle. Auf diese Punkte wird im folgenden näher eingegangen.

#### 4.2.2.1. Sequenzabhängigkeit der immunstimulatorischen RNA

Die Erkennung der verwendeten isRNA 9.3 und die darauf folgende Immunstimulation von Zellen war in unseren Versuchen stets abhängig von der Anwesenheit einer immunstimulatorischen Sequenz. Die gezeigten Versuche sind mit ssRNA-Molekülen durchgeführt worden, welche entweder die Sequenz 5'-UGGUAAUUGA**AAGGACAGGU**dTdT-3' (isRNA 9.3 *antisense*) oder 5'-UUGAAGGACAG**GUUAAGCU**dTdT-3' (isRNA 9.2 *antisense*) enthielt. Diese Sequenzen leiteten sich aus einem vorhergehenden Projekt ab, in dem versucht wurde, mittels siRNA die Expression eines Proteins zu unterdrücken. Die dort verwendeten Sequenzen hatten überraschenderweise zu einer starken Immunstimulation geführt. Diese Experimente zeigten zum ersten Mal das Potenzial von kurzen RNA-Molekülen, TLRs zu stimulieren (Hornung, Guenther-Biller et al. 2005).

Die fett beschrifteten Basen stellten das tatsächlich immunstimulatorische Motiv dar. Unterschiede in der immunstimulatorischen Potenz dieser zwei wurden zunächst nicht erkannt, auch das zu dieser Sequenz komplementäre Basenstück war immunstimulatorisch und verhielt sich ähnlich wie die genannten RNA-Sequenzen. Die Verwendung dieser Sequenzen als Doppelstrang dagegen offenbarten einige substantielle Unterschiede, welche weiter unten erläutert werden.

Darüber hinaus haben zahlreiche in unserem Labor durchgeführte Experimente zur genaueren Charakterisierung isRNAs die Erkenntnis erbracht, dass neben den hier verwendeten Sequenzen eine Vielzahl weiterer immunstimulatorischer Sequenzen existiert (Daten werden nicht gezeigt). Analog zu anderen Arbeiten nahmen die Basen Guanosin und Uridin eine zentrale Stellung ein (Diebold, Kaisho et al. 2004; Heil, Hemmi et al. 2004).

Wie oben beschrieben, wurden die verwendeten Sequenzen sowohl von TLR7 und TLR8 erkannt. Es gibt vereinzelte Hinweise, dass es darüber hinaus RNA-Sequenzen zu geben scheint, die für entweder TLR7 oder TLR8 spezifisch sein sollen. Heil und Mitarbeiter isolierten aus dem Genom des *human immunodeficiency virus-1* (HIV-1) eine einzelsträngige Sequenz, die in TLR8-transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (Hek 293) eine Aktivierung erzielte, nicht jedoch in TLR7-transfizierten Zellen (Heil, Hemmi et al. 2004). Kontrollen zeigten, dass TLR7 in diesen Zelllinien funktionell aktiv gewesen war. Ob sich diese Rezeptorspezifität jedoch auf human Immunzellen wie die PDCs übertragen lässt, konnte in dieser Publikation nicht

charakterisiert werden. Eigene Ergebnisse unter Verwendung der damals beschriebenen RNA-Sequenz (ssRNA40) sprechen für eine starke Präferenz von TLR8, jedoch nicht für eine Selektivität (Daten werden nicht gezeigt).

Die exakte Vorhersage, ob eine RNA-Sequenz zu einer Immunstimulation führt, ist aus zwei Gründen von enormer Bedeutung. Zum einen muss beim Design von therapeutischen siRNAs die immunstimulatorische Komponente eines solchen Moleküls bedacht werden. Zum anderen könnte durch die genaue Charakterisierung immunstimulatorischer Sequenzen die Möglichkeit geschaffen werden, Moleküle von unterschiedlicher Spezifität zu generieren und so ein mögliches therapeutisches Potenzial dieser Molekülklasse auszuweiten. Weitere Ausführungen über dieses therapeutische Potenzial finden sich unter 4.3. „Klinische Bedeutung der Ergebnisse“.

#### 4.2.2.2. Strukturelle Aspekte der immunstimulatorischen RNA

Interessant ist, dass die Komposition als Einzelstrang oder Doppelstrang zu unterschiedlichen Immunphänomenen führte. Sehr eindrucksvoll ließ sich dies auf der Ebene der zellulären Zytokin-Induktion charakterisieren. Während die einzelsträngige isRNA in PBMCs viel IL-12 und wenig IFN- $\alpha$  induzierte, verhielt sich die homologe Sequenz als dsRNA genau gegensätzlich. Welche Mechanismen für diese Unterschiede verantwortlich waren, bleibt weiteren wissenschaftlichen Untersuchungen vorbehalten. Es ist unseren Ergebnissen zufolge unwahrscheinlich, dass dieser Effekt aufgrund unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation zustande kommt. Beide Moleküle (Einzelstrang und Doppelstrang) wurden über dasselbe Rezeptorpaar im endosomalen Kompartiment erkannt. Ob jedoch zusätzliche Mechanismen aktiviert oder blockiert werden und so zu einem veränderten Zytokinprofil führen, konnte nicht charakterisiert werden. Es bleibt damit unklar, ob aus dieser Unterscheidung für das Immunsystem eine Bedeutung erwächst und welche Gewichtung ihr zugeordnet werden könnte.

Eine strikte Unterscheidung von TLR7 und TLR8 bei der Erkennung von dsRNA gegenüber ssRNA konnte durch unsere Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen im murinen System zeigten eindeutig eine Aktivierung von TLR7 nach Stimulation mit ssRNA. Die Aktivierung von humanen PDCs bestätigt, dass die Erkennung von einzelsträngiger isRNA über TLR7 auch im humanen System möglich ist, denn diese Zelle verfügt nicht über TLR8. Die Erkennung von doppelsträngiger RNA über TLR7 ist bekannt (Hornung, Guenthner-Biller et al. 2005). Zusätzlich konnten wir eine Erkennung von doppelsträngiger und einzelsträngiger isRNA durch

TLR8 beobachten, denn Monozyten, die keinen TLR7 aber TLR8 tragen, wurden konsequent aktiviert.

Weitere unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass die für eine immunstimulatorische Wirkung erforderliche Mindestlänge des Motivs weitaus kürzer sein darf als die in dieser Arbeit verwendeten neunbasigen Motive. Eine Einbettung in ein RNA-Oligonukleotid von mindestens 19mer war jedoch in jedem Fall erforderlich, um erkannt zu werden.

#### 4.2.2.3. *Delivery* der immunstimulatorischen RNA

Die Wirkungen der immunstimulatorischen RNA-Moleküle, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurden, konnten nur erzielt werden, wenn sich die isRNA im endosomalen Kompartiment befand. Diese wichtige Erkenntnis beruht auf experimenteller Darstellung des Transfektionsvorgangs der isRNA. Anhand geeigneter Markierung der isRNA mit fluoreszierenden Markerstoffen konnten wir die exakte subzelluläre Lokalisation der isRNA mittels konventioneller und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bestimmen (Ablasser et al., unveröffentlichte Daten). Die Aufnahme der isRNA in die Zelle und in das endosomale Kompartiment konnte nur dann stattfinden, wenn die RNA-Moleküle an Träger-Moleküle gebunden wurden. Als Trägermoleküle eigneten sich polykationische Peptide wie zum Beispiel verschieden lange Poly-L-Arginin-Ketten (eigene Beobachtungen) genauso wie bestimmte Ammoniumsulfat-Verbindungen (DOTAP, eigene Beobachtungen sowie Heil, Hemmi et al. 2004). Diebold und Mitarbeiter verwendeten für die Zelltransfektion neben DOTAP erfolgreich Polyethylenimin (Diebold, Kaisho et al. 2004).

#### 4.2.3. Das Zytokin-Induktionsmuster nach Stimulation mit immunstimulatorischer RNA

##### 4.2.3.1. Induktion von IL-12p70

Unsere Untersuchungen zur Zytokin-Induktion innerhalb des Verbundes von mononukleären, immunkompetenten Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) zeigten eine starke Induktion des Typ I IFN (IFN- $\alpha$ ) sowie der biologisch aktiven Form des IL-12 (IL-12p70). Die genaue Analyse der beobachteten Zytokin-Induktion an hoch aufgereinigten Zellpopulationen erbrachte die Erkenntnis, dass durch Stimulation mit isRNA IL-12p70 prinzipiell von Monozyten und IFN- $\alpha$  von PDCs produziert werden.

PDCs erkennen isRNA über TLR7. Monozyten besitzen kein TLR7 aber TLR8 und erkannten isRNA über diesen Rezeptor. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Publikationen der Forscher der Firma *3M Pharmaceuticals* (Gorden, Gorski et al. 2005). Gordon und Mitarbeiter beobachteten ein Zell-spezifisches Zytokin-Induktionsmuster in PBMCs nach Stimulation mit synthetischen, Rezeptor-spezifischen Liganden für TLR7 und TLR8. Für die Stimulation mit TLR7-Liganden beobachteten sie eine Zytokinantwort, die von IFN- $\alpha$  dominiert wurde. Nach Stimulation mit Liganden für TLR8 kam es zu einer Zytokin-Induktion, in der IL-12 und IFN- $\gamma$  dominierten. Analog zu unseren Experimenten mit isRNA, die unseren Ergebnissen zufolge beide Rezeptoren stimulierte, führten synthetische Liganden für TLR7 und TLR8 zu einer Induktion aller genannten Zytokine. Die Zytokinantwort war in unseren Versuchen verglichen mit den synthetischen TLR-Liganden deutlich stärker. Zusätzlich soll darauf verwiesen werden, dass in der zitierten Publikation IL-12p40/70 und nicht – wie in dieser Arbeit – die biologisch aktive Form IL-12p70 gemessen wurde.

IL-12 besitzt eine essentielle Rolle bei der Generierung einer zellvermittelten, T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunreaktion (Trinchieri 2003). Die Induktion von IL-12p70 in myeloiden Zellen und Monozyten ist ein viel beforschtes Gebiet und es hat in den letzten Jahren wichtige Fortschritte gegeben, die Hinweise zum Mechanismus der IL-12p70-Induktion in diesen Zellen liefern. Zum einen vermögen es unter gewissen Voraussetzungen inaktivierte, gram-positive Bakterien IL-12p70 in Monozyten und MDCs zu induzieren (Hermann, Rubio et al. 1998; Karlsson, Larsson et al. 2004; Muller-Berghaus, Olson et al. 2005). Darüber hinaus konnten Wagner und Bullens unabhängig voneinander zeigen, dass synergistische Stimulation durch TLR-Liganden und CD40L, welches eine so genannte T-Zell-Hilfe repräsentiert, eine IL-12p70-Produktion generieren kann (Bullens, Kasran et al. 2001; Wagner, Poeck et al. 2004). Sugiyama und Mitarbeiter beschreiben in einer Publikation von 2005 eine der CpG-DNA verwandten CpG-RNA, welche in humanen CD14<sup>+</sup> CD11<sup>+</sup> Monozyten IL-12p70 induzierte (Sugiyama, Gursel et al. 2005).

Gautier und Mitarbeiter zeigten 2005, dass myeloide und monozytäre DCs zur kompetenten IL-12p70-Produktion nur durch die synergistische Stimulation von TLR8 und zusätzlich entweder durch TLR3 oder TLR4 befähigt sind (Gautier, Humbert et al. 2005). Napolitani und Lanzavecchia kamen noch im gleichen Jahr zu demselben Schluss (Napolitani, Rinaldi et al. 2005). Susanne Roth und Isabel Bekeredjian-Ding aus dem eigenen Labor bestätigten kurze Zeit später diese Beobachtungen zusätzlich

für die IL-12p70-Produktion durch naive Monozyten (Bekeredjian-Ding, Roth et al. 2006). All diesen Arbeiten ist es gemein, dass eine Kombination aus mehreren Stimuli notwendig waren, um eine potente IL-12-Produktion zu generieren. Aus dieser Sicht sind unsere Ergebnisse von entscheidender Bedeutung, dass wir einen einzelnen Stimulus entwickeln konnten, der durch TLR7- und TLR8-Stimulation ein Zytokoinmuster einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunreaktion induzierte.

Unsere Ergebnisse haben weiter gezeigt, dass durch isRNA als alleiniger TLR-Stimulus in PBMCs sowie in reinen Monozyten IL-12p70 induziert werden konnte. Gleiches galt für die Untersuchungen des TLR8-Liganden (3M-002) und des Liganden für TLR7/8 (3M-003). Diese Ergebnisse stehen somit im Widerspruch zu der zuletzt zitierten Beobachtung von Roth, dass die IL-12p70-Induktion zusätzlich zur TLR8-Stimulation eine synergistische Aktivierung von TLR3 oder TLR4 benötigt. Eine synergistische Aktivierung mit LPS durch die Kontamination des Mediums in unseren experimentellen Ansätzen konnten in unserem System ausgeschlossen werden. Zum einen induzierten die von uns verwendeten Medien *per se* kein TNF- $\alpha$  (Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache implizierte, dass keine Kontamination mit Endotoxinen vorlag. Zum anderen hatte die stichprobenartige Verwendung autologer Seren für die Medium-Präparation keinen Einfluss auf die Ergebnisse unserer Experimente (Daten nicht gezeigt). Letztlich wurden diese Unterschiede durch die verschiedenen Techniken der Durchführung der Experimente erklärt. Allen voran scheinen Unterschiede in der Isolationstechnik der einzelnen Zellpopulationen verantwortlich gewesen zu sein.

Eine erzeugte Immunstimulation, welche die Aktivierung von TLR3 oder TLR4 beinhaltet, besitzt geringes Potenzial als klinisches Therapeutikum. Bei der Wahl des Aufbaus unserer Experimente wurden daher eventuelle synergistische Effekte durch zusätzliche TLR3- oder TLR4-Stimulation bewusst nicht untersucht. Eine artifizielle Stimulation von TLR3- oder TLR4 im Rahmen einer Immuntherapie würde zu einer unkontrollierten und unspezifischen Immunreaktion führen und birgt somit ein erhebliches gesundheitliches Risiko.

#### 4.2.3.2. Induktion von IFN- $\gamma$

Durch die Verwendung selektiver, synthetischer Liganden für TLR7 und TLR8 sowie Stimulation von TLR9 mit CpG-ODN fiel in unseren Experimenten auf, dass die IFN- $\gamma$ -Produktion stark mit der Induktion von IL-12p70, nicht aber mit der Induktion von Typ I IFN korrelierte. Diese Aussage steht nicht im Widerspruch mit der Vielzahl von

Publikationen, die den Typ I IFN eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen zuerkennen (Colonna, Trinchieri et al. 2004). Es muss jedoch zwingend zwischen der Aufregulation von CD69, Zytotoxizität und Zytokin (IFN- $\gamma$ )-Induktion als mögliche Formen der Aktivierung von NK-Zellen unterschieden werden. Die Expression von CD69 auf der Zelloberfläche und eine verstärkte zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Virus-infizierten oder maligne-entarteten Zellen kann durch die Stimulation mit TLR-Liganden gesteigert werden (Colonna, Trinchieri et al. 2004; Romagnani, Della Chiesa et al. 2005). Gerosa zeigte in einer Publikation von 2005, dass die Induktion von CD69 und Zytotoxizität der NK-Zellen abhängig ist von der Induktion von Typ I IFN. Die Induktion von IFN- $\gamma$  war jedoch unabhängig von Typ I IFN und abhängig von IL-12 (Gerosa, Gobbi et al. 2005). Diese Aussagen konnten für ein System gezeigt werden, in dem MDCs *in vitro* mit TLR3-Ligand Poly(I:C) stimuliert wurden. Unter diesen Bedingungen produzieren MDCs sowohl IFN- $\alpha$  als auch IL-12.

Die in unseren Experimenten gemachte Erkenntnis, dass eine Stimulation von TLR8, nicht aber die Stimulation von TLR9 zu einer robusten IFN- $\gamma$ -Induktion führte, stimmt mit einer kürzlich publizierten Arbeit von Gorski und Mitarbeitern überein (Gorski, Waller et al. 2006). Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen beobachteten sie über die Korrelation der Induktion von IL-12p70 und IFN- $\gamma$  hinaus zusätzlich eine Korrelation für IL-18 und IFN- $\gamma$ . Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass die alleinige Stimulation von TLR7 durch 3M-001 in ihren Experimenten zu keiner IFN- $\gamma$  Antwort geführt hatte. In unserer Arbeit wurde IFN- $\gamma$  unter der Verwendung desselben Liganden für TLR7 induziert. Mehrere Erklärungen kommen für diese Abweichung in Frage. Zum einen verwendeten die Forscher um Gorski bis zu 10-fach geringere Konzentrationen für die Stimulation von fünfmal mehr Zellen und beschrieben eine dosisabhängige IFN- $\gamma$ -Induktion. Darüber hinaus könnte anzunehmen sein, dass ein weiterer, über die Stimulation von TLR7 induzierter Faktor für die von uns beobachtete IL-12p70 unabhängige IFN- $\gamma$  verantwortlich war.

In beiden Arbeiten konnte kein IFN- $\gamma$  durch CpG-ODNs induziert werden (CpG-A und -B für unsere Arbeit, CpG-A, -B und -C für Gorski und Mitarbeiter). Ebenfalls keine Induktion von IFN- $\gamma$  durch CpG-A und -B fanden Gerosa und Mitarbeiter in ihren Untersuchungen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass eine effektive IFN- $\gamma$ -Induktion im humanen System vor allem über die Stimulation von TLR8 und die darauf folgende Induktion des regulatorischen IL-12 zu erzielen war. Die alleinige Stimulation von TLR7 und TLR9



fürte nicht zur Induktion von IL-12 und damit nicht zur Produktion von IFN- $\gamma$ . Diese Erkenntnisse verdeutlichen die zentrale Stellung der IL-12-Induktion bei der Generierung einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunantwort durch TLR-Stimulation.

#### 4.2.4. Abhängigkeit von akzessorischen Zellen bei der Aktivierung der Immunabwehrzellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die IFN- $\gamma$ -Produktion neben der Aktivierung von T-Zellen vor allem auf die Aktivierung der NK-Zellen zurückzuführen war. NK-Zellen sind in der Literatur als Hauptquelle der IFN- $\gamma$ -Produktion beschrieben (Trinchieri 1989). Die TLR-vermittelte Induktion von IFN- $\gamma$  konnte in unseren Versuchen nicht über eine direkte Interaktion zwischen dem Liganden und der Effektorzelle erreicht werden, sondern war abhängig von der Anwesenheit akzessorischer Zellen. Dies betraf alle in dieser Arbeit verwendeten TLR-Liganden, die zu einer Aktivierung geführt haben. Einzige Ausnahme war die Stimulation von TLR3 durch den Liganden Poly(I:C).

Monozyten und PDCs wurden im humanen System als akzessorische Zellpopulation zur Aktivierung von NK-Zellen identifiziert. Unsere Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass zusätzlich weitere Zellpopulationen diese Rolle einzunehmen vermögen. Es ist anzunehmen, dass prinzipiell alle APCs, die entweder TLR7 oder TLR8 exprimieren, diese Fähigkeit besitzen. Bei der Aktivierung von NK-Zellen entstanden erhebliche Unterschiede über das Ausmaß und die Art der Aktivierung. Diese waren abhängig davon, durch welche akzessorische Zellen sie aktiviert wurden.

##### 4.2.4.1. Monozyten als akzessorische Zellen

Die Fragestellung, inwieweit es durch TLR-Stimulation zu einer direkten Stimulation von Effektorzellen kommen kann, ist nicht vollständig beantwortet und wird in der Literatur eingehend diskutiert. Dies betrifft aufgrund der Aktualität besonders die TLR7- und TLR8-vermittelte Stimulation. Caron und Mitarbeiter sahen in ihren Experimenten eine direkte Aktivierung von humanen T-Zellen durch Liganden für TLR5 und TLR7/8 (Caron, Duluc et al. 2005). Reine T-Zell-Populationen zeigten in dortigen Experimenten eine vermehrte Proliferation und produzierten IFN- $\gamma$ . Jedoch war eine synergistische Aktivierung mit einem Anti-CD3-monoklonaler Antikörper als TLR-abhängigen Stimulus oder IL-2 als TLR-unabhängigen Stimulus für die direkte

Aktivierung von T-Zellen nötig. Keine Reaktion durch T-Zellen erfolgte durch Stimulation mit TLR3-Ligand Poly(I:C) und TLR4-Ligand LPS. Eine weitere Arbeitsgruppe veröffentlichte 2005 die These, dass eine Vorstimulation von NK-Zellen mit IL-2 eine direkte Aktivierung der NK-Zellen durch den TLR7/8 Agonisten R848 erreicht werden kann (Hart, Athie-Morales et al. 2005). Dies betraf in der zitierten Studie die Aufregulation von CD69 auf der Oberfläche von reinen NK-Zell-Populationen. IFN- $\gamma$  konnte selbst nach Vorstimulation mit IL-2 nicht induziert werden. Inwieweit diese Beobachtungen auf eine veränderte Expression von TLR7- oder TLR8-mRNA zurückzuführen waren, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Weder unsere Ergebnisse noch die Ergebnisse von Gorski oder Gordon konnten eine veränderte mRNA Expression des TLR-Profiles in NK-Zellen durch eine (Vor-) Stimulation identifizieren (Die Ergebnisse hierzu werden unter 4.2.6. diskutiert). Entsprechend konnten die Ergebnisse von Hart und Mitarbeitern nicht reproduziert werden. Wodurch diese unterschiedlichen Beobachtungen zustande kommen, ist daher nicht geklärt. Eine Erklärung ist, dass die verwendeten NK-Zellpopulationen mit akzessorischen Zellen kontaminiert waren. In unseren Experimenten hatte sich gezeigt, dass es ohne explizite Eliminationsverfahren akzessorischer Zellen in der NK-Zellpopulation zu einer scheinbar direkten Aktivierung von NK-Zellen kam.

Die direkte Stimulation von NK-Zellen durch lange dsRNA über TLR3 dagegen gilt als allgemein akzeptiert (Schmidt, Leung et al. 2004). NK-Zellen exprimieren geringe Mengen an funktionellem TLR3 (Alexopoulou, Holt et al. 2001; Hornung, Rothenfusser et al. 2002). Die synthetische Doppelstrang-RNA Poly(I:C) führt selbst bei höchsten Reinheiten von NK-Zell-Populationen zu einer Aufregulation von CD69 sowie zu einer, wenn auch geringen, IFN- $\gamma$ -Produktion. Diese Aussage konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Anwendung entsprechender Kontrollen reproduziert werden. Insgesamt muss die Rolle von TLR3 bei der Erkennung von RNA aber neu überdacht werden. Die kürzlich beschriebenen zytosolischen Proteine RIG I und Mda5 erkennen dsRNA. Es ist anzunehmen, dass einige der Effekte, die ursprünglich der Erkennung über TLR3 zugeschrieben wurden, zumindest teilweise in Wahrheit auf der Erkennung von RIG I und Mda5 beruhen.

#### 4.2.4.2. Plasmazytoide dendritische Zellen als akzessorische Zellen

Neben Monozyten wurden auch PDCs als potenzielle akzessorische Zellen für die Aktivierung von NK-Zellen identifiziert. Eine Interaktion dieser beiden Zellpopulationen

ist im Rahmen einer Entzündungsreaktion beschrieben (Moretta 2002; Colonna, Trinchieri et al. 2004; Moretta 2005; Romagnani, Della Chiesa et al. 2005). In unserer Arbeit führte die Aktivierung von PDCs wie bei Monozyten auf NK-Zellen zu einer Aufregulation von CD69. Im Gegensatz zu Monozyten konnten sie jedoch in NK-Zellen kein IFN- $\gamma$  induzieren. Auch hatte ein Fehlen der PDCs im Zellverband der PBMCs keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -Produktion. Der Grund für diese substantiellen Unterschiede ist darin zu sehen, dass PDCs nach TLR7-Stimulation kein IL-12 induzieren. Entsprechende Kontrollen für sämtliche untersuchten TLRs konnten ebenfalls kein IFN- $\gamma$  induzieren, das ausschließlich über die Aktivierung der PDCs zustande gekommen wäre.

Diese Beobachtungen beziehen sich vornehmlich auf unsere Experimente im humanen System. Vergleiche mit dem murinen System bezüglich der Zytokin-Induktion nach TLR7-Stimulation weisen einige substantielle Unterschiede auf. Im Gegensatz zur humanen PDC produzierte die murine PDC nach TLR7-Stimulation IL-12 und induziert somit IFN- $\gamma$ . TLR8 ist im murinen System allen Erkenntnissen nach nicht mit ssRNA zu stimulieren. MDCs tragen entgegen dem humanen System im murinen System TLR7 (Hornung, Rothenfusser et al. 2002; Gordon, Qiu et al. 2006). Dies erklärt, warum im murinen System über eine alleinige Stimulation von TLR7 eine ausgeprägte, T<sub>H</sub>1-gerichtete Immunantwort mit IL-12 und IFN- $\gamma$  zu erzeugen ist, im humanen System jedoch nur unter zusätzlicher Stimulation von TLR8.

#### 4.2.5. Reziproke Aktivierung akzessorischer Zellen durch Immuneffektorzellen

Neben der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen kommt dieser Zellpopulation darüber hinaus besonders in der frühen Phase einer Immunreaktion eine entscheidende regulatorische Rolle zu (Moretta 2005). Dazu gehört auch die zelluläre Interaktion mit denjenigen Zellen, die NK-Zellen zunächst aktiviert hatten – so können NK-Zellen nach Aktivierung DCs reziprok zur Ausreifung stimulieren (positive Stimulation) oder in die Apoptose führen (negative Stimulation) (Raulet 2004). Die Mechanismen, die für den genauen Ablauf dieses so genannten *Crosstalks* zwischen NK-Zellen und DCs und anderen regulatorischen Zellen in der frühen Phase einer Entzündungsreaktion verantwortlich sind, bleiben weiter Gegenstand der aktuellen Forschung.

Unsere Experimente zeigten, dass Effektorzellen durch isRNA indirekt über akzessorische Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion stimuliert wurden. Untersuchungen des Aktivierungsgrades der akzessorischen Zellen während dieser Stimulation ergaben,

dass darüber hinaus diese Aktivierung einem reziproken Mechanismus unterlag. Reziproke Mechanismen der gegenseitigen Interaktion, bei denen sich Effektorzellen und immunmodulierende Zellen gegenseitig zu einer stärkeren Aktivierung aktivieren, wurden in der Fachliteratur insbesondere von der Arbeitsgruppe um Gerosa und Trinchieri beschrieben (Gerosa, Baldani-Guerra et al. 2002; Gerosa, Gobbi et al. 2005).

Im Unterschied zu unseren Experimenten mit Monozyten als Interaktionspartner bezogen sich diese Untersuchungen jedoch ausschließlich auf die Interaktion mit DCs. In einer der Publikationen konnte die Gruppe 2002 zeigen, dass NK-Zellen durch die Anwesenheit von unreifen DCs und geeigneter Stimuli für die DCs – nicht aber für die NK-Zellen – aktiviert wurden (Gerosa, Baldani-Guerra et al. 2002). Als Aktivierungsmarker für NK-Zellen galten in dieser Publikation eine Aufregulation von CD69 auf der Oberfläche und eine gesteigerte Zytotoxizität. Umgekehrt wurden DCs stärker zur Ausreifung aktiviert als in Abwesenheit von NK-Zellen. Als Aktivierungsmarker für DCs wurden eine Aufregulation von CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-DR sowie die Produktion von IL-12 untersucht. Besonders eindrucksvoll war dieser Effekt unter Bedingungen, in denen Stimuli verwendet wurden, welche ohne die Anwesenheit von NK-Zellen nicht zu einer Maturation von DCs geführt hatten. Diese waren suboptimale Konzentrationen von LPS, inaktivierte Mykobakterien oder rekombinantes IFN- $\alpha$ . Die Interaktion der beiden Zellen unter diesen suboptimalen Bedingungen hatte zu einer suffizienten Ausreifung der DCs und zu einer Aktivierung von NK-Zellen geführt.

Gerosa und Mitarbeiter weiteten in einer weiteren Publikation von 2005 ihre Beobachtungen bezüglich der reziproken Interaktion zwischen DCs und NK-Zellen aus. Ihnen fiel auf, dass PDCs nach einer Stimulation mit CpG-2216 und in Anwesenheit von IL-2 aktivierten NK-Zellen mehr IFN- $\alpha$  produzierten als PDCs alleine. Darüber hinaus wurde unter denselben Bedingungen die Induktion von IFN- $\alpha$  nach Stimulation von CpG-2006 ermöglicht. CpG-2006 ist *per se* nur ein sehr schwacher Induktor von IFN- $\alpha$  in reinen PDCs. Besonders interessant war es, dass die genannten Beobachtungen nur in der Anwesenheit von IL-2 aktivierten, nicht aber in der Gegenwart von unstimulierten NK-Zellen gemacht werden konnten. Eine Stimulation der PDCs mit CpG-ODNs befähigte diese Zellen demnach nicht, NK-Zellen soweit zu aktivieren, dass reziprok die IFN- $\alpha$ -Antwort der PDCs alterniert werden konnte.

Unsere Versuche haben gezeigt, dass die Stimulation von Monozyten in Anwesenheit unstimulierter NK-Zellen mit isRNA zu einer gesteigerten Aktivierung beider

Zellpopulationen führt. Monozyten aktivierten demnach NK-Zellen, diese steigerten reziprok in Monozyten die IL-12p70-Produktion.

Durch unsere Ergebnisse konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein *Crosstalk*, das heißt eine reziproke, gegenseitige Aktivierung, nicht nur zwischen DCs verschiedener Arten und NK-Zellen, sondern zusätzlich auch zwischen Monozyten und NK-Zellen möglich ist. Die Interaktion zwischen Monozyten und NK-Zellen könnte im Rahmen der frühen Phase einer Immunreaktion dazu beitragen, das Ineinandergreifen der angeborenen und der adaptiven Immunität zu erleichtern. Zusätzlich könnte derselbe Mechanismus einen starken regulatorischen Einfluss im Sinne der Induktion einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort nehmen und so die Erkennung und Bekämpfung viraler Infektion und maligner Erkrankungen durch das Immunsystem erleichtern. Welche Mechanismen eine überschießende Reaktion des Immunsystems nach Erkennung eines Pathogens kontrollieren, bleibt weiter Gegenstand der Forschung.

#### 4.2.6. Lösliche Faktoren und Zell-Zellkontakt bei der Aktivierung von Natürlichen Killerzellen

Für die Interaktion zwischen Effektorzellen und regulatorischen Zellen sind sowohl Zell-Zellkontakte wie auch lösliche Faktoren von entscheidender Bedeutung (Raulet 2004). Dies betrifft auch die Interaktion von NK-Zellen und DCs (Fernandez, Lozier et al. 1999; Fernandez, Flament et al. 2002; Piccioli, Sbrana et al. 2002). Das regulatorische Zytokin IL-12 besitzt die Fähigkeit, NK-Zellen zu aktivieren (Trinchieri 1998; Trinchieri 1998; Trinchieri 1998). In unseren Versuchen war eine Aktivierung der NK-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion innerhalb von PBMCs beinahe gänzlich abhängig von IL-12p70. Diese Beobachtung steht in Diskrepanz zu den bereits weiter oben zitierten Publikationen von Gorski und Mitarbeitern (Gorski, Waller et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um Gorski erkannte für IL-12p70 im Bezug auf die IFN- $\gamma$ -Produktion durch NK-Zellen eine weitaus weniger wichtige Rolle. Eine Inhibition dieses Zytokins innerhalb von PBMCs durch einen Anti-IL-12-Antikörper führte zu keiner Verminderung der IFN- $\gamma$ -Produktion. Dies steht im Widerspruch zu unseren Untersuchungen. Vielmehr beschrieben die Autoren eine essentielle Rolle von IL-18. Blocken dieses Zytokins alleine führte zu einer starken Verminderung der IFN- $\gamma$ -Produktion, jedoch war auch unter diesen Bedingungen ein Rest IFN- $\gamma$  vorhanden. Erst die Verwendung von Antikörpern gegen IL-12p70 und IL-18 in Kombination führten zur gänzlichen

Abwesenheit von IFN- $\gamma$ . Das zusätzliche Blocken von IL-18 hatte in unseren Versuchen keinerlei Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Antwort in PBMCs.

Eine Möglichkeit, die diese Unterschiede erklären könnte, ist die Verwendung unterschiedlicher Liganden für die Stimulation von TLR8. Die beschriebenen Beobachtungen durch Gorski wurden unter Verwendung des synthetischen Liganden für TLR8 (3M-002) bzw. für TLR7 und TLR8 (3M-003) gemacht. Unsere Ergebnisse wurden nach Stimulation mit isRNA erhoben. Obwohl für beide Formen der Stimulation angenommen wird, dass eine Erkennung über TLR8 stattfindet und die folgende Aktivierung der NK-Zellen in ihrem Profil starke Ähnlichkeiten aufweist, könnten dennoch Unterschiede im Aktivierungsprofil dieser Liganden bestehen. Gorski und Mitarbeiter verwendeten in Ihren Versuchen neben den synthetischen Liganden ebenfalls eine dem von uns verwendeten Stimulus näher verwandte ssRNA, von der angenommen wird, dass sie TLR8 stimuliert (Heil, Hemmi et al. 2004; Gorski, Waller et al. 2006). Unter Verwendung dieser Stimulation erkannte die Arbeitsgruppe ebenfalls keinen starken Einfluss von IL-12p70, jedoch war auch der Einfluss von IL-18 geringer und ein gemeinsames Blocken von IL-12p70 und IL-18 konnte nicht, wie unter der Verwendung von synthetischen TLR8-Liganden beobachtet, zu einer Abwesenheit von IFN- $\gamma$  führen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedliche Beschaffenheit von Liganden für TLR8 eventuell zu unterschiedlichen Aktivierungsprofilen in akzessorischen Zellen führen, die dann auf unterschiedliche Weise NK-Zellen aktivieren. Darüber hinaus bleibt zu erörtern, inwieweit eine selektive Blockierung von IL-12p70 bzw. IL-12p40 diese Ergebnisse beeinflusst.

Gerosa und Mitarbeiter beschrieben in ihrer Publikation von 2002, dass für die Aktivierung von NK-Zellen durch DCs in erster Linie ein Zell-zu-Zell Kontakt der beiden Zellen verantwortlich war und dass weder IL-12 noch IL-2 Einfluss auf die Aktivierung hatten. Unseren Ergebnissen zufolge stellte IL-12 das essentielle Zytokin für die Aktivierung der NK-Zelle dar. IL-12p70 war alleine ausreichend für eine IFN- $\gamma$ -Induktion, nicht jedoch ein alleiniger Zell-Zellkontakt. Allerdings muss in diesem Vergleich zwischen der Art der Aktivierung unterschieden werden, denn während sich die Autoren dieser Publikation auf die Aufregulation von CD69 und die Induktion von Zytotoxizität und damit auf die Effektor-Komponente dieser Zellen bezogen, untersuchten wir über die Detektion von IFN- $\gamma$  zusätzlich potenzielle regulatorische Aspekte. Auch unterschieden sich die Art der aktivierenden Zellen und deren Stimulation (MDCs und LPS bzw. IFN- $\alpha$  für Gerosa und Mitarbeiter; Monozyten und isRNA für die vorliegende Arbeit). Dennoch muss angenommen werden, dass die

Aufregulation von CD69, die Induktion von Zytotoxizität und die Induktion von IFN- $\gamma$  generell auf unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung zurückzuführen sind und prinzipiell nicht zwingend miteinander korrelieren müssen.

#### 4.2.7. Steigerung der zytotoxischen Aktivität durch immunstimulatorische RNA

Eine einzigartige Fähigkeit der NK-Zellen ist es, andere Zellen ohne vorhergehende Sensibilisierung und ohne Antigenpräsentation eliminieren zu können (Moretta, Bottino et al. 1996; Long 1999; Lopez-Botet, Llano et al. 2000; Vilches and Parham 2002). NK-Zellen nehmen durch diese Fähigkeit innerhalb des Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung Virus-infizierter und maligne veränderter Zellen ein. Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, gerade eine potenzielle Aktivierung dieser Komponente der NK-Zellen durch die Stimulation von isRNAs zu untersuchen. Durch die Verwendung einer Vielzahl von Kontrollen und alternativen Stimuli bezüglich der Zytotoxizität von NK-Zellen sollte zusätzlich die Möglichkeit geschaffen werden, eine potenzielle Aktivierung sicher in die bereits bestehende Literatur einordnen zu können. Dabei fokussierten wir uns in dieser Arbeit auf die Induktion von Zytotoxizität durch die Stimulation von TLRs.

Unsere Versuche zeigten, dass isRNAs zu einer enorm starken zytotoxischen Aktivität gegenüber entsprechenden Targetzellen führte. Die Ergebnisse der verwendeten Kontrolle deckten sich mit den von Gorski publizierten Ergebnissen (Gorski, Waller et al. 2006). Die Bindung und konsequente Aktivierung von TLR8 und TLR7/8 scheint dabei eine stärkere Wirkung bezüglich der Zytotoxizität zu besitzen als die alleinige Aktivierung von TLR7. Im Einklang mit diesen Beobachtungen bestanden signifikante Unterschiede für das Ausmaß der Zytotoxizität zwischen isRNAs und synthetischen TLR-Liganden für TLR7, nicht aber für Liganden, welche die Aktivierung von TLR8 hervorrufen. Obwohl einzelsträngige und doppelsträngige isRNA ein unterschiedliches Bild bei der Induktion von IFN- $\alpha$ , IL-12p70 und IFN- $\gamma$  gezeichnet hatten, bestanden keine Unterschiede bezüglich der Zytotoxizität. Die durch isRNAs induzierte Zytotoxizität war in derselben Größenordnung anzufinden wie die Zytotoxizität hervorgerufen durch den bekannten Induktor Poly(I:C). Die Zytotoxizität durch isRNAs war Sequenz-spezifisch, die Trägerproteine alleine oder gebunden an unspezifische RNA-Sequenzen konnten keine Zytotoxizität induzieren. isRNAs führten zu mehr Zytotoxizität als Kontrollen mit TLR9-Aktivierung mit CpG-A und CpG-B.

Analog zu den Beobachtungen zur Aufregulation von CD69 und der IFN- $\gamma$ -Induktion konnten keine direkten Effekte auf NK-Zellen für die gesteigerte Zytotoxizität ausgemacht werden. Interessant war, dass der TLR3-Ligand Poly(I:C) zwar durch direkte Aktivierung zu einer geringen Induktion von IFN- $\gamma$  und zur Aufregulation von CD69 führte, jedoch keine zytotoxische Aktivität durch *direkte* Stimulation entfalten konnte. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Beobachtungen von Gerosa und Mitarbeitern (Gerosa, Gobbi et al. 2005). Die direkte Stimulation von aufgereinigten NK-Zell-Populationen mit IL-2 dagegen führte in unseren Experimenten zu einer starken Steigerung der Zytotoxizität.

Es wurde bereits angesprochen, dass mehrere Formen der Aktivierung von NK-Zellen beschrieben sind und diese nicht zwingend miteinander korrelieren müssen. Zu den Aktivierungsformen der NK-Zellen zählen die Aufregulation von CD69, die Induktion von IFN- $\gamma$  genauso wie die zytotoxische Aktivität. Es bestehen Hinweise, dass die unterschiedlichen Aktivierungsformen der NK-Zellen auf verschiedene Weise reguliert werden. In der Abbildung 20 sind die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen schematisch aufgeführt und verdeutlichen so diese Interpretation.

Interessant ist, dass für die Induktion von Zytotoxizität weder IFN- $\gamma$ , IL-12p70 noch IFN- $\alpha$  unabdingbar zu sein scheinen. TLR9-Agonisten können kein IFN- $\gamma$  induzieren, weder in PBMCs noch in aufgereinigten PDCs kultiviert mit NK-Zellen. Innerhalb von PBMCs induzierten TLR9-Agonisten eine beträchtliche Zytotoxizität, wenn auch weniger als isRNAs. Gerosa und Mitarbeiter zeigten, dass PDCs kultiviert mit NK-Zellen bei einem Verhältnis von 1:20 kein IFN- $\gamma$  induzieren, jedoch CD69 aufregulieren und zu einer gesteigerten Zytotoxizität führen (Gerosa, Gobbi et al. 2005). In dieser Publikation konnte IFN- $\alpha$  für die Zytotoxizität verantwortlich gemacht werden. TLR7-Liganden induzieren starke Zytotoxizität, ohne IL-12p70 zu induzieren (Gorski, Waller et al. 2006). Die höchste Zytotoxizität wurde für die Stimulation mit IL-2 in PBMCs gefunden. IL-2 konnte NK-Zellen auch direkt stimulieren und Zytotoxizität induzieren. Die IFN- $\gamma$ -Produktion, welche IL-2 in PBMCs induzierte, war im Verhältnis zu anderen verwendeten Stimuli sehr gering. TLR3-Agonisten wie Poly(I:C) führten insgesamt zu einer geringen IFN- $\gamma$ -Produktion in PBMCs, führten aber zu einer ausgeprägten Zytotoxizität. Nie wurde jedoch Zytotoxizität durch einen TLR-Liganden induziert, ohne dass nicht mindestens eines der drei genannten Zytokine (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  oder IL-12p70) vorhanden gewesen wäre. Es ist daher anzunehmen, dass NK-Zellen auf unterschiedliche Weise zur Zytotoxizität aktiviert werden, zum einen über die Induktion von IL-12p70 und IFN- $\gamma$ , vermittelt über regulatorische Zellen der myeloiden



Reihe, zum anderen über IFN- $\alpha$ , vermittelt über PDCs. Unseren Ergebnissen zufolge war die Induktion der lytischen Aktivität durch NK-Zellen aktiviert über IL-12p70 und IFN- $\gamma$  leicht stärker als die Induktion durch IFN- $\alpha$ . Die genauen Mechanismen, welche der Regulation zytotoxischer Aktivität gegenüber den an der Zelloberfläche veränderten Targetzellen zugrunde lagen, konnte in dieser Arbeit nicht entschlüsselt werden.

Aktivierung	Akkz. Zellen	TLR3	TLR7	TLR8	TLR7/8	isRNA	TLR9	IL-2
<b>CD69- Aufregulation</b>	PBMC	+	+	+	+	+	+	n.u.
	PDC	-	+	+	+	(+)	+	n.u.
	Monozyten	+	-	++	+	+++	n.u.	n.u.
<b>IFN-<math>\gamma</math>- Induktion</b>	PBMC	+	+	++	++	++	-	(+)
	PDC	-	-	-	-	-	-	n.u.
	Monozyten	+	+	++	+	++	n.u.	n.u.
<b>Zytotoxizität</b>	PBMC	++	+(+)	++	++	++	+(+)	+++

**Abb. 20 Überblick über die verschiedenen Aktivierungsformen der NK-Zellen durch Stimulation mit TLR-Liganden**

Die Abbildung repräsentiert einen Überblick über die verschiedenen Aktivierungsformen der NK-Zellen hervorgerufen durch Stimulation mit TLR-Liganden sowie mit IL-2. Die Aktivierungsformen beinhalten eine Aufregulation von CD69 auf der Oberfläche sowie die Induktion von IFN- $\gamma$  gemessen in den Überständen der Zellkulturen. Die zytotoxische Aktivität wurde durch  $^{51}\text{Chrom}$ -Lyse-Assay mit entsprechend markierten Daudi-Zellen durchgeführt. Daudi-Zellen stellen aufgrund ihres alternierten Status von MHC-Klasse I Molekülen ein „natürliches“ Angriffssignal für NK-Zellen dar. Die verschiedenen Formen der Aktivierung müssen nicht zwingend miteinander korrelieren, dies betrifft auch die Induktion von IFN- $\gamma$  und die Zytotoxizität. Weil NK-Zellen durch die aufgeführten Liganden nicht direkt aktiviert werden konnten (eine Ausnahme stellt die Aktivierung von TLR3 dar, dieser Rezeptor wird von NK-Zellen exprimiert und ist funktionell aktiv), sind zusätzlich die Zellen mit aufgeführt, durch deren Hilfe es zu indirekten Aktivierungsphänomenen gekommen war (Akkz. Zellen: PBMC, PDC oder Monozyten). -, (+), +, ++, und +++ repräsentieren verschiedene Ausmaße der Aktivierung von NK-Zellen (n.u. = nicht untersucht).

#### 4.2.8. *Toll-like*-Rezeptor-Expressionsmuster von Natürlichen Killerzellen

Mitarbeiter unseres Labors beschrieben 2002 erstmals das Profil der TLR-Verteilung auf den verschiedenen Immunzellpopulationen des humanen Immunsystems (Hornung, Rothenfusser et al. 2002). Sie fanden bei ihren Untersuchungen, für die sie die Expression von mRNA für die verschiedenen TLRs herangezogen hatten, dass die einzelnen Zellpopulationen sehr unterschiedliche Expressionsmuster für diese Rezeptoren besitzen und dass das Expressionsmuster der jeweiligen Zelle mit der Funktionalität bezüglich dieser Rezeptoren übereinstimmt. Das genaue Expressionsmuster für TLRs wurde in der Einleitung eingehend erläutert. Die damaligen Beobachtungen bezüglich des Expressionsmusters ohne Stimulation wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit reproduziert. Diese Ergebnisse decken sich ebenfalls mit den Beobachtungen von Gorski und Mitarbeitern. Sie fanden für NK-Zellen eine Expression der mRNA für TLR2, TLR3, TLR5 und TLR6, jedoch nicht für TLR4, TLR7, TLR8 oder TLR9. Eine genaue Charakterisierung ergab zusätzlich, dass *CD56-bright* NK-Zellen TLR2 und TLR3 exprimierten, *CD56-dim* NK-Zellen jedoch lediglich TLR3. Entsprechend ihrer TLR-Expression reagierten *CD56-dim* NK-Zellen auf eine Stimulation mit Poly(I:C). Eine Überprüfung der Funktionalität von TLR2 auf *CD56-bright* NK-Zellen konnte nicht erfolgen, da diese Subpopulation für eine Aufreinigung und separate Stimulation im menschlichen Blut zu selten ist. Eine andere Arbeit von Becker zeigte, dass aus *Leishmania* isoliertes Lipophosphoglykan NK-Zellen über TLR2 zu aktivieren vermag (Becker, Salaiza et al. 2003). In unserer Arbeit wurde innerhalb der NK-Zellen nicht zwischen den Subpopulationen *CD56-dim* und *CD56-bright* innerhalb von NK-Zellen unterschieden.

Die Expression von TLRs kann nach Stimulation gewissen Alterationen unterliegen (Hornung, Rothenfusser et al. 2002; Bekeredjian-Ding, Wagner et al. 2005). Dies betraf vor allem die Expression von mRNA für TLR7 und TLR9. Nach einer Stimulation mit CpG-ODN kam es diesen Publikationen zufolge zu einer Herabregulation von mRNA für TLR9 und einer Aufregulation von TLR7 in PDCs (Hornung) und B-Zellen (Bekeredjian-Ding).

In unseren Experimenten untersuchten wir die Expression von mRNA für TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 nach Stimulation mit isRNA und nach Vorinkubation mit IFN- $\gamma$ . Eine ähnliche Alteration wie durch die Stimulation mit CpG-ODNs konnten wir für die Stimulation von TLR7 und TLR8 nicht beobachten. Auch kam es durch eine Vorstimulation nicht zu verändert starken Zytokin-Induktionen gegenüber der

eigentlichen Stimulation. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Gorski, die ebenfalls keine Veränderungen der mRNA für diese Rezeptoren beobachteten (Gorski, Waller et al. 2006). Roth und Mitarbeiter erkannten in ihren Ergebnissen weder eine veränderte Expression für TLRs noch eine veränderte Zytokin-Induktion durch eine Vorstimulation mit rekombinantem INF- $\alpha$  oder rekombinantem IFN- $\beta$  (Bekeredjian-Ding, Roth et al. 2006).

Diesbezüglich andere Ergebnisse stammen von Hart und Mitarbeiter (Hart, Athie-Morales et al. 2005). Sie beschrieben in ihren Experimenten für NK-Zellen die Expression von mRNA für TLR7 und TLR8. Zwar war eine funktionelle Aktivität für TLR7 und TLR8 der NK-Zellen zunächst nicht gegeben, konnte aber durch die Vorstimulation mit IL-2 erreicht werden. Ob diese Vorstimulation auf eine veränderte mRNA Expression dieser Rezeptoren zurückzuführen war, konnte nicht geklärt werden.

Ebenfalls im Widerspruch zu unseren Ergebnissen stehen Ergebnisse von der Arbeitsgruppe um Moretta. Diese Arbeitsgruppe vertritt die These, dass TLR9 in NK-Zellen exprimiert wird und dass dieser Rezeptor funktionell aktiv ist (Sivori, Falco et al. 2004; Sivori, Carlomagno et al. 2006). Bei diesen Ergebnissen muss beachtet werden, dass die zur TLR9 verwendeten CpG-ODNs an ihren Enden repetitive Guanin-Sequenzen enthalten. Adäquate Kontrollen, in denen die Erkennung dieser repetitiven Guanin-Sequenzen durch die NK-Zellen ausgeschlossen werden konnte, existieren nach unserem Kenntnisstand nicht. So ist es nämlich möglich, dass es in dieser Publikation zu einer TLR9-unabhängigen Stimulation von NK-Zellen gekommen ist.

### 4.3. Klinische Bedeutung der Ergebnisse

NK-Zellen besitzen im Rahmen von Entzündungsreaktionen über ihre eigentliche Funktion als Effektorzellen hinaus auch regulatorische Fähigkeiten. Ergebnisse dieser Arbeit beinhalten wichtige Erkenntnisse beider Aspekte.

#### 4.3.1. Interaktion von Monozyten und Natürlichen Killerzellen bei der Erkennung von Pathogenen in entzündeten Geweben

Der Population von NK-Zellen wird eine regulatorische Rolle vor allem in der frühen Phase der Immunreaktion zuerkannt (Moretta, Marcenaro et al. 2005). Durch sie erfolgt die Lyse Virus-infizierter Zellen und Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung. Freigesetztes apoptotisches Material wird von reifen DCs aufgenommen und prozessiert, die Präsentation auf MHC-I-Molekülen führt zur Initiierung einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort und der Ausbildung spezifischer CTLs.

In dieser frühen Phase kommt es zu einer ausgeprägten Kommunikation zwischen NK-Zellen und DCs in dessen Folge beide Zellpopulationen sich gegenseitig aktivieren. Somit kann die Fremderkennung durch NK-Zellen auch als verlängerter Arm der Fremderkennung durch DCs verstanden werden. Zunächst sind gewebsständige DCs wie Makrophagen Interaktionspartner der NK-Zellen, in der Folge der Immunreaktion werden jedoch zunehmend Monozyten aus dem peripheren Blut in das entzündete Gewebe gelockt und reifen dort zu MDCs aus (Moretta 2002). Dass zusätzlich NK-Zellen auch mit naiven Monozyten interagieren, war vor dieser Arbeit nicht bekannt. Die erhobenen Ergebnisse ergänzen Monozyten als einen Interaktionspartner für NK-Zellen in entzündeten Geweben. Diese Tatsache unterstreicht zusätzlich die tragende Rolle der NK-Zellen in der frühen Phase einer Entzündungsreaktion.

#### 4.3.2. Monozyten sind für die Erkennung von Viren wichtig

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass naive Monozyten RNA erkannten und eine Immunantwort in Gang setzen können. Dies verdeutlicht die Rolle von Monozyten als Zellen des Immunsystems, die zur Erkennung viraler Infektionen im menschlichen Organismus befähigt sind.

#### 4.3.3. RNA als spezifisches immunstimulatorisches Adjuvans

isRNA stellt ein spezifisches und starkes Signal für die Aktivierung des Immunsystems dar. Es ist im Zuge der Ausführungen dieser Arbeit klar geworden, dass die Aktivierung spezifischer TLRs durch isRNA zu einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort führt und somit insbesondere solche immunkompetenten Zellen aktiviert, die letztendlich für die Elimination einer Virus-infizierten oder maligne entarteten Zelle verantwortlich sind. Moleküle, welche sich die Eigenschaften der isRNAs zunutze machen, stellen ein großes Potenzial für die erfolgreiche Behandlung verschiedenster infektiöser und maligner Erkrankungen dar.

Wie uns die Forschung der letzten Jahre gezeigt hat, haben isRNAs zusätzliche Vorteile gegenüber immunstimulatorischer DNA. Letztere sind als Immuntherapeutika im humanen System fehlgeschlagen. Die erfolgsversprechenden Ergebnisse aus dem Mausmodell ließen sich im human System nicht bestätigen. Dies liegt zum Großteil an der beschriebenen unterschiedlichen Verteilung der TLRs in Maus und Mensch. Eine auf TLR9-gerichtete Immuntherapie mit CpG-ODNs war in der Maus sehr erfolgreich, weil TLR9 auf PDCs und auf MDCs der Maus exprimiert werden und es zu einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort über IL-12 und  $IFN-\gamma$  kommt. Die beschriebenen Ausführungen verdeutlichen, dass im humanen System eine solche Immunreaktion alleine über die TLR9-Stimulation nicht zu erzielen ist. Es bedarf der Stimulation der myeloiden Zellreihe über TLR8. Nur über sie kann IL-12 und konsekutiv  $IFN-\gamma$  im Sinne einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort generiert werden. Die in dieser Arbeit beschriebene isRNA besitzt dieses Potenzial.

Zusätzlich beinhalten isRNAs aufgrund der nahen strukturellen Verwandtheit zu siRNAs das Potenzial, immunstimulatorische Moleküle zu entwickeln, die das Immunsystem spezifisch aktivieren und gleichzeitig ein spezifisches Zielgen stummschalten können. Diese Kombination wäre beispielsweise bei Behandlung einer Infektion mit dem HI-Virus sinnvoll: Eine in den Körper eingebrachte RNA könnte zu einem spezifischen Stummschalten von Genen, die den Replikationszyklus des HI-Virus aufrechterhalten, zum Beispiel die Reverse Transkriptase, Integrase oder Protease, führen. Das gleiche Molekül bewirkt eine Aktivierung von Effektorzellen, welche jetzt verstärkt solche Zellen eliminieren, in denen die Infektion bereits etabliert ist. Weitere Erkenntnisse zu der potenziell simultanen Stummschaltung und Immunstimulation durch RNAs konnten durch Poeck und Mitarbeiter beschrieben werden. Sie beschrieben eine siRNA gegen das antiapoptotische *B-cell lymphoma 2* (Bcl2) von Melanomen, an dessen 5'-Enden sich jeweils ein Triphosphat befand

(3P-siRNA) (Poeck, Besch et al. 2008). Die spezifische siRNA regulierte das für den Tumor überlebenswichtige Bcl2 herab, das Triphosphat am 5'-Ende des Doppelstrangs fungierte als Ligand für RIG I und führte zur Interferon-Antwort. Auf diese Weise kam es in dem genannten Experimenten zu einer verstärkten Apoptose von Tumorzellen, wobei Genregulation und Immunstimulation synergistisch wirkten.

## 5. Zusammenfassung

Die Entwicklung immunstimulatorischer Nukleinsäuren eröffnet ein großes Potenzial für die Konzeption neuartiger Therapiestrategien. Das Prinzip dieser Medikamentenklasse ist es, selektiv und spezifisch Rezeptoren des Immunsystems zu stimulieren und über diesen Mechanismus kontrolliert eine  $T_H1$ -gerichtete Immunreaktion auszulösen. Die natürliche Aufgabe des Immunsystems, Infektionen und Tumore zu bekämpfen, wird auf diese Weise unterstützt. Immunstimulatorische Nukleinsäuren, die auf DNA-ODNs basieren, konnten der klinischen Prüfung im fortgeschrittenen Stadium nicht standhalten. Dies begründet sich unter anderem dadurch, dass DNA-ODNs die myeloiden Zellen nicht erreichen und damit essentielle Zytokine einer  $T_H1$ -gerichteten Immunantwort nicht induziert werden. Es besteht zu Recht die Erwartung, dass isRNAs aufgrund ihrer Wirkung an TLR7 und TLR8 und über letzteren Rezeptor auf myeloiden Zellen dieses Defizit überkommen können.

Die Eigenschaften, die eine RNA für eine spezifische Immunstimulation aufweisen muss, wurden kürzlich identifiziert. isRNAs werden durch dieselbe Gruppe von Rezeptoren der angeborenen Immunität erkannt wie immunstimulatorische DNA. Für beide Moleküle besteht eine ausgeprägte Zell-Spezifität, diese wird durch eine differenzielle Expression der TLRs auf den verschiedenen Immunzellen bedingt. Darüber hinaus sind sie spezifisch für ihre Rezeptoren. Immunstimulatorische DNA wird über TLR9 vor allem durch PDCs und B-Zellen erkannt. isRNA vermag es, PDCs über TLR7 zu stimulieren. Von besonderer Bedeutung ist die Stimulation von TLR8 durch isRNAs auf myeloiden Zellen. Man nimmt an, dass nach TLR-Stimulation es nur durch die Stimulation von TLR8 im humanen System zur  $T_H1$ -gerichteten Immunreaktion kommt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die durch die isRNAs hervorgerufenen Phänomene in Effektorzellen des humanen Immunsystems zu charakterisieren. NK-Zellen sind nach Stimulation mit isRNA hauptverantwortlich für die beobachtete  $IFN-\gamma$ -Produktion in PBMCs. Eine Aktivierung von NK-Zellen kann durch die Stimulation mit isRNA auf drei Ebenen erreicht werden:

1. isRNA reguliert das Oberflächenmolekül CD69 auf der Oberfläche von NK-Zellen hoch.
2. isRNA induziert in NK-Zellen die Produktion von  $IFN-\gamma$ .

3. isRNA steigert in NK-Zellen die Zytotoxizität gegenüber der Targetzelllinie Daudi.

Über die Mechanismen dieser vielschichtigen Aktivierung von NK-Zellen durch isRNA können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die Aktivierung der NK-Zellen kann nicht direkt durch isRNA erreicht werden, sondern benötigt die Anwesenheit akzessorischer Zellen. Als solche wurden PDCs und vor allem Monozyten identifiziert.
2. Monozyten werden durch isRNA direkt zur IL-12p70-Produktion stimuliert.
3. Es bestehen Unterschiede im Ausmaß der Aktivierung, je nachdem, ob die NK-Zellen indirekt über PDCs oder über Monozyten aktiviert werden. Monozyten führen im Gegensatz zu PDCs zu einer 4-fach stärkeren Aufregulation von CD69. Darüber hinaus sind einzig Monozyten dazu im Stande, in NK-Zellen IFN- $\gamma$  zu induzieren.
4. Die Kommunikation zwischen akzessorischen Zellen und NK-Zellen erfolgt über lösliche Mediatoren. IL-12 konnte als essentiell für die isRNA-vermittelte IFN- $\gamma$ -Induktion entschlüsselt werden.
5. Zusätzliche Zell-Zellkontakte verstärken die Induktion von IFN- $\gamma$ , sind alleine aber nicht hinreichend für eine Aktivierung.
6. Die indirekte Aktivierung von NK-Zellen zur IFN- $\gamma$ -Produktion ist TLR-abhängig.

Es ist deutlich geworden, dass bei der Entstehung einer T<sub>H</sub>1-gerichteten Immunreaktion nicht nur die Interaktion zwischen NK-Zellen und DCs entscheidend ist, sondern auch eine effektive Kommunikation bei der Erkennung viraler Strukturen zwischen NK-Zellen und Monozyten stattfindet.

isRNAs wurden aufgrund genauer Beobachtungen bei Untersuchungen zum Gen-*silencing* entdeckt und weisen starke strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu diesen auf. Bedeutsam ist, dass der Mechanismus der Immunstimulation und die Fähigkeit, Gene spezifisch stumm zu schalten, unabhängig voneinander funktionieren und in einem kurzen RNA-Molekül vereint sein können. Die Entwicklung von Therapeutika, welche auf immunstimulatorischen RNA-Sequenzen basieren, besitzt das Potenzial, ein Medikament zu verwenden, dass gleichzeitig zu einer Aktivierung des Immunsystems und zu einem spezifischen Stummschalten eines Zielgens fähig wäre. Dies ist zum Beispiel in einer Situation von großem Vorteil, in dem ein maligner



Tumor durch das Immunsystem einerseits und durch den Einsatz von Gene-*silencing* andererseits therapiert werden soll. Gegenüber immunstimulatorischen DNA besitzen isRNAs zusätzlich den Vorteil, durch die spezifische Stimulation neben PDCs und B-Zellen auch Monozyten, MDCs und Makrophagen zu erreichen.

Das Potenzial von isRNAs konnte in dieser Arbeit verdeutlicht werden. Dies trifft insbesondere für die Aktivierung solcher Zellen zu, die letztendlich im Rahmen viraler und maligner Erkrankungen zu einem günstigen Heilungsverlauf beitragen. Der Erforschung der für die Erkennung von kurzen RNA-Molekülen verantwortlichen Mechanismen sowie der Entwicklung immunstimulatorischer RNA-basierter Therapeutika kommt in Zukunft ein hoher Stellenwert zu.

## Literaturverzeichnis

- Abb, J., H. Abb, et al. (1983). "Characterization of human interferon-gamma-producing leukocytes with monoclonal antileukocyte antibodies." Med Microbiol Immunol **171**(4): 215-23.
- Agnello, D., C. S. Lankford, et al. (2003). "Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights." J Clin Immunol **23**(3): 147-61.
- Airoldi, I., G. Gri, et al. (2000). "Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells." J Immunol **165**(12): 6880-8.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." Nature **413**(6857): 732-8.
- Aliberti, J., C. Reis e Sousa, et al. (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells." Nat Immunol **1**(1): 83-7.
- Anderson, K. V. (2000). "Toll signaling pathways in the innate immune response." Curr Opin Immunol **12**(1): 13-9.
- Andrews, N. W. and P. Webster (1991). "Phagolysosomal escape by intracellular pathogens." Parasitol Today **7**(12): 335-40.
- Arai, S., R. Meagher, et al. (2008). "Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial." Cytotherapy **10**(6): 625-32.
- Ballas, Z. K., A. M. Krieg, et al. (2001). "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs." J Immunol **167**(9): 4878-86.
- Ballas, Z. K., W. L. Rasmussen, et al. (1996). "Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA." J Immunol **157**(5): 1840-5.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Barton, G. M. and R. Medzhitov (2002). "Toll-like receptors and their ligands." Curr Top Microbiol Immunol **270**: 81-92.
- Becker, I., N. Salaiza, et al. (2003). "Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 65-74.
- Bekeredjian-Ding, I., S. I. Roth, et al. (2006). "T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes." J Immunol **176**(12): 7438-46.
- Bekeredjian-Ding, I. B., M. Wagner, et al. (2005). "Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN." J Immunol **174**(7): 4043-50.
- Belvin, M. P. and K. V. Anderson (1996). "A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 393-416.
- Billiau, A. (1996). "Interferon-gamma in autoimmunity." Cytokine Growth Factor Rev **7**(1): 25-34.
- Biron, C. A., K. S. Byron, et al. (1989). "Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells." N Engl J Med **320**(26): 1731-5.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, et al. (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol **17**: 189-220.
- Bogdan, C. (2000). "The function of type I interferons in antimicrobial immunity." Curr Opin Immunol **12**(4): 419-24.
- Brawand, P., D. R. Fitzpatrick, et al. (2002). "Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs." J Immunol **169**(12): 6711-9.

- Brunda, M. J. and M. K. Gately (1995). "Interleukin-12: potential role in cancer therapy." *Important Adv Oncol*: 3-18.
- Brunda, M. J., L. Luistro, et al. (1993). "Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors." *J Exp Med* **178**(4): 1223-30.
- Bullens, D. M., A. Kasran, et al. (2001). "CD40L-induced IL-12 production is further enhanced by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13." *Scand J Immunol* **53**(5): 455-63.
- Burns, L. J., D. J. Weisdorf, et al. (2000). "Enhancement of the anti-tumor activity of a peripheral blood progenitor cell graft by mobilization with interleukin 2 plus granulocyte colony-stimulating factor in patients with advanced breast cancer." *Exp Hematol* **28**(1): 96-103.
- Caron, G., D. Duluc, et al. (2005). "Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells." *J Immunol* **175**(3): 1551-7.
- Caux, C., C. Massacrier, et al. (1997). "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis." *Blood* **90**(4): 1458-70.
- Cella, M., D. Jarrossay, et al. (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." *Nat Med* **5**(8): 919-23.
- Chamaillard, M., M. Hashimoto, et al. (2003). "An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid." *Nat Immunol* **4**(7): 702-7.
- Chang, E. and S. A. Rosenberg (2001). "Patients with melanoma metastases at cutaneous and subcutaneous sites are highly susceptible to interleukin-2-based therapy." *J Immunother* **24**(1): 88-90.
- Chaug, H. C. (2006). "CpG oligodeoxynucleotides as DNA adjuvants in vertebrates and their applications in immunotherapy." *Int Immunopharmacol* **6**(10): 1586-96.
- Chehimi, J., S. E. Starr, et al. (1989). "Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood." *Immunology* **68**(4): 486-90.
- Chu, W. M., D. Ostertag, et al. (1999). "JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection." *Immunity* **11**(6): 721-31.
- Colombo, M. P. and G. Trinchieri (2002). "Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 155-68.
- Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." *Nat Immunol* **5**(12): 1219-26.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." *Science* **286**(5447): 2098-102.
- da Costa, L., C. Renner, et al. (2000). "Immune recruitment by bispecific antibodies for the treatment of Hodgkin disease." *Cancer Chemother Pharmacol* **46 Suppl**: S33-6.
- Davis, M. M., J. J. Boniface, et al. (1998). "Ligand recognition by alpha beta T cell receptors." *Annu Rev Immunol* **16**: 523-44.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." *Science* **303**(5663): 1529-31.
- Diebold, S. S., M. Montoya, et al. (2003). "Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers." *Nature* **424**(6946): 324-8.
- Doyle, S., S. Vaidya, et al. (2002). "IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program." *Immunity* **17**(3): 251-63.
- Dzionek, A., Y. Sohma, et al. (2001). "BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction." *J Exp Med* **194**(12): 1823-34.

- Ebert, R. H. F., H. W. (1939). "The extravascular development of the monocyte observed in vivo." *Brit. J. Exp. Pathol.* (20): 342–356.
- El Andaloussi, A., A. M. Sonabend, et al. (2006). "Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors." *Glia* **54**(6): 526-35.
- Facchetti, F., W. Vermi, et al. (2003). "The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells." *Virchows Arch* **443**(6): 703-17.
- Farrar, M. A. and R. D. Schreiber (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." *Annu Rev Immunol* **11**: 571-611.
- Feldman, M. and P. Fitzgerald-Bocarsly (1990). "Sequential enrichment and immunocytochemical visualization of human interferon-alpha-producing cells." *J Interferon Res* **10**(4): 435-46.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, et al. (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." *J Exp Med* **195**(3): 343-51.
- Fernandez, N. C., C. Flament, et al. (2002). "Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk." *Eur Cytokine Netw* **13**(1): 17-27.
- Fernandez, N. C., A. Lozier, et al. (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." *Nat Med* **5**(4): 405-11.
- Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, et al. (2003). "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF." *J Exp Med* **198**(7): 1043-55.
- Fong, L. and E. G. Engleman (2000). "Dendritic cells in cancer immunotherapy." *Annu Rev Immunol* **18**: 245-73.
- Gately, M. K., B. B. Desai, et al. (1991). "Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)." *J Immunol* **147**(3): 874-82.
- Gautier, G., M. Humbert, et al. (2005). "A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells." *J Exp Med* **201**(9): 1435-46.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, et al. (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." *J Exp Med* **195**(3): 327-33.
- Gerosa, F., A. Gobbi, et al. (2005). "The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions." *J Immunol* **174**(2): 727-34.
- Girardin, S. E., I. G. Boneca, et al. (2003). "Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan." *Science* **300**(5625): 1584-7.
- Goerdts, S. and C. E. Orfanos (1999). "Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells." *Immunity* **10**(2): 137-42.
- Gong, J. H., G. Maki, et al. (1994). "Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells." *Leukemia* **8**(4): 652-8.
- Gorden, K. B., K. S. Gorski, et al. (2005). "Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8." *J Immunol* **174**(3): 1259-68.
- Gorden, K. K., X. X. Qiu, et al. (2006). "Cutting Edge: Activation of Murine TLR8 by a Combination of Imidazoquinoline Immune Response Modifiers and PolyT Oligodeoxynucleotides." *J Immunol* **177**(10): 6584-7.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." *Nat Rev Immunol* **3**(1): 23-35.
- Gorski, K. S., E. L. Waller, et al. (2006). "Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists." *Int Immunol* **18**(7): 1115-26.

- Grohmann, U., M. L. Belladonna, et al. (1998). "IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production." *Immunity* **9**(3): 315-23.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* **185**(6): 1101-11.
- Gubler, U., A. O. Chua, et al. (1991). "Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(10): 4143-7.
- Guermonprez, P., J. Valladeau, et al. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **20**: 621-67.
- Hart, O. M., V. Athie-Morales, et al. (2005). "TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production." *J Immunol* **175**(3): 1636-42.
- Hartmann, G., R. D. Weeratna, et al. (2000). "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo." *J Immunol* **164**(3): 1617-24.
- Hashimoto, C., K. L. Hudson, et al. (1988). "The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." *Cell* **52**(2): 269-79.
- Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* **410**(6832): 1099-103.
- Hayday, A. C. (2000). "[gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection." *Annu Rev Immunol* **18**: 975-1026.
- Hayes, R. L., M. Koslow, et al. (1995). "Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma." *Cancer* **76**(5): 840-52.
- Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-9.
- Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nat Immunol* **3**(2): 196-200.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* **408**(6813): 740-5.
- Hennecke, J. and D. C. Wiley (2001). "T cell receptor-MHC interactions up close." *Cell* **104**(1): 1-4.
- Herbomel, P., B. Thisse, et al. (1999). "Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo." *Development* **126**(17): 3735-45.
- Hermann, P., M. Rubio, et al. (1998). "IFN-alpha priming of human monocytes differentially regulates gram-positive and gram-negative bacteria-induced IL-10 release and selectively enhances IL-12p70, CD80, and MHC class I expression." *J Immunol* **161**(4): 2011-8.
- Hornung, V., J. Ellegast, et al. (2006). "5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I." *Science*.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, et al. (2005). "Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." *Nat Med* **11**(3): 263-70.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, et al. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." *J Immunol* **168**(9): 4531-7.
- Hornung, V., J. Schlender, et al. (2004). "Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus." *J Immunol* **173**(10): 5935-43.

- Hoshino, K., O. Takeuchi, et al. (1999). "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." *J Immunol* **162**(7): 3749-52.
- Hughes, D. A. and S. Gordon (1998). "Expression and function of the type 3 complement receptor in tissues of the developing mouse." *J Immunol* **160**(9): 4543-52.
- Hume, D. A., S. J. Monkley, et al. (1995). "Detection of c-fms protooncogene in early mouse embryos by whole mount in situ hybridization indicates roles for macrophages in tissue remodelling." *Br J Haematol* **90**(4): 939-42.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**(927): 258-67.
- Isaacs, A., J. Lindenmann, et al. (1957). "Virus interference. II. Some properties of interferon." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**(927): 268-73.
- Ishii, K. J., S. Uematsu, et al. (2006). "'Toll' gates for future immunotherapy." *Curr Pharm Des* **12**(32): 4135-42.
- Ito, T., M. Inaba, et al. (1999). "A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells." *J Immunol* **163**(3): 1409-19.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." *Immunol Today* **13**(1): 11-6.
- Judge, A. D., V. Sood, et al. (2005). "Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA." *Nat Biotechnol* **23**(4): 457-62.
- Jurk, M., F. Heil, et al. (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." *Nat Immunol* **3**(6): 499.
- Kaplan, M. H., Y. L. Sun, et al. (1996). "Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice." *Nature* **382**(6587): 174-7.
- Kariko, K., M. Buckstein, et al. (2005). "Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA." *Immunity* **23**(2): 165-75.
- Karlsson, H., P. Larsson, et al. (2004). "Pattern of cytokine responses to gram-positive and gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells." *Infect Immun* **72**(5): 2671-8.
- Kato, H., S. Sato, et al. (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." *Immunity* **23**(1): 19-28.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* **441**(7089): 101-5.
- Kim, S., K. Iizuka, et al. (2000). "In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2731-6.
- Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." *Annu Rev Immunol* **20**: 709-60.
- Krieg, A. M. (2006). "Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation." *Nat Rev Drug Discov* **5**(6): 471-84.
- Krug, A., S. Rothenfusser, et al. (2001). "Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells." *Eur J Immunol* **31**(7): 2154-63.
- Kumagai, Y., O. Takeuchi, et al. (2008). "Pathogen recognition by innate receptors." *J Infect Chemother* **14**(2): 86-92.
- Kumar, A., J. Haque, et al. (1994). "Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(14): 6288-92.
- Kurt-Jones, E. A., L. Popova, et al. (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." *Nat Immunol* **1**(5): 398-401.

- Lampson, G. P., A. A. Tytell, et al. (1967). "Inducers of interferon and host resistance. I. Double-stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosum*." Proc Natl Acad Sci U S A **58**(2): 782-9.
- Lanier, L. L. (1998). "Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I." Cell **92**(6): 705-7.
- Lanier, L. L., J. J. Ruitenberg, et al. (1988). "Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes." J Immunol **141**(10): 3478-85.
- Le Bon, A., G. Schiavoni, et al. (2001). "Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo." Immunity **14**(4): 461-70.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-83.
- Lennert, K. and W. Remmele (1958). "[Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]." Acta Haematol **19**(2): 99-113.
- Lichanska, A. M. and D. A. Hume (2000). "Origins and functions of phagocytes in the embryo." Exp Hematol **28**(6): 601-11.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." Immunol Today **11**(7): 237-44.
- Long, E. O. (1999). "Regulation of immune responses through inhibitory receptors." Annu Rev Immunol **17**: 875-904.
- Lopez-Botet, M., M. Llano, et al. (2000). "NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules." Semin Immunol **12**(2): 109-19.
- Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." Blood **45**(3): 321-34.
- Maggi Jr., L. B., Heitmeier, M. R., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Buller, R. M., and Corbett, J. A. (2000). "Potential role of PKR in double-stranded RNA-induced macrophage activation." EMBO J. **19**: 3630 – 3638. .
- Maraninchi, D., N. Vey, et al. (1998). "A phase II study of interleukin-2 in 49 patients with relapsed or refractory acute leukemia." Leuk Lymphoma **31**(3-4): 343-9.
- Margolin, K. and S. J. Forman (2000). "Immunotherapy with interleukin-2 after hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy." Cancer J Sci Am **6 Suppl 1**: S33-8.
- Margolin, K. A. (2000). "Interleukin-2 in the treatment of renal cancer." Semin Oncol **27**(2): 194-203.
- Marshall, J. D., D. S. Heeke, et al. (2006). "Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha." Immunology **117**(1): 38-46.
- Matsumoto, M., K. Funami, et al. (2003). "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells." J Immunol **171**(6): 3154-62.
- Mebius, R. E. (2003). "Organogenesis of lymphoid tissues." Nat Rev Immunol **3**(4): 292-303.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Melchjorsen, J., S. B. Jensen, et al. (2005). "Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner." J Virol **79**(20): 12944-51.
- Mellman, I. and R. M. Steinman (2001). "Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines." Cell **106**(3): 255-8.

- Merberg, D. M., S. F. Wolf, et al. (1992). "Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family." *Immunol Today* **13**(2): 77-8.
- Mingari, M. C., A. Poggi, et al. (1991). "In vitro proliferation and cloning of CD3- CD16+ cells from human thymocyte precursors." *J Exp Med* **174**(1): 21-6.
- Minks, M. A., D. K. West, et al. (1979). "Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells." *J Biol Chem* **254**(20): 10180-3.
- Moretta, A. (2002). "Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 957-64.
- Moretta, A. (2005). "The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells." *Curr Opin Immunol* **17**(3): 306-11.
- Moretta, A., C. Bottino, et al. (1996). "Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells." *Annu Rev Immunol* **14**: 619-48.
- Moretta, A., E. Marcenaro, et al. (2005). "Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues." *Trends Immunol* **26**(12): 668-75.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." *J Leukoc Biol* **73**(2): 209-12.
- Mulatero, C. W., R. T. Penson, et al. (2001). "A phase II study of combined intravenous and subcutaneous interleukin-2 in malignant pleural mesothelioma." *Lung Cancer* **31**(1): 67-72.
- Muller-Berghaus, J., W. C. Olson, et al. (2005). "IL-12 production by human monocyte-derived dendritic cells: looking at the single cell." *J Immunother* **28**(4): 306-13.
- Muzio, M., D. Bosisio, et al. (2000). "Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells." *J Immunol* **164**(11): 5998-6004.
- Nagano, Y. and Y. Kojima (1954). "[Immunizing property of vaccinia virus inactivated by ultraviolet rays]." *C R Seances Soc Biol Fil* **148**(19-20): 1700-2.
- Nanni, P., G. Nicoletti, et al. (2001). "Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice." *J Exp Med* **194**(9): 1195-205.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, et al. (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." *Nat Immunol* **6**(8): 769-76.
- Nicolas, E., A. J. Nappi, et al. (1996). "Expression of antimicrobial peptide genes after infection by parasitoid wasps in *Drosophila*." *Dev Comp Immunol* **20**(3): 175-81.
- Noguchi, Y., A. Jungbluth, et al. (1996). "Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11798-801.
- Nomura, F., S. Akashi, et al. (2000). "Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression." *J Immunol* **164**(7): 3476-9.
- Nomura, M., Y. Takihara, et al. (1994). "Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a *Drosophila* polyhomeotic protein." *Differentiation* **57**(1): 39-50.
- O'Doherty, U., M. Peng, et al. (1994). "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." *Immunology* **82**(3): 487-93.
- Ohashi, K., V. Burkart, et al. (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." *J Immunol* **164**(2): 558-61.
- Ohnishi, Y., M. E. Gershwin, et al. (1980). "Tumorigenicity of human malignant lymphoblasts: comparative study with unmanipulated nude mice,



- antilymphocyte serum-treated nude mice, and X-irradiated nude mice." J Natl Cancer Inst **65**(4): 715-8.
- Okamura, Y., M. Watari, et al. (2001). "The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4." J Biol Chem **276**(13): 10229-33.
- Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity **13**(5): 715-25.
- Ozinsky, A., K. D. Smith, et al. (2000). "Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors." J Endotoxin Res **6**(5): 393-6.
- Ozinsky, A., D. M. Underhill, et al. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13766-71.
- Passlick, B., D. Flieger, et al. (1989). "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." Blood **74**(7): 2527-34.
- Peiser, L., M. P. De Winther, et al. (2002). "The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses." Infect Immun **70**(10): 5346-54.
- Peiser, L., S. Mukhopadhyay, et al. (2002). "Scavenger receptors in innate immunity." Curr Opin Immunol **14**(1): 123-8.
- Perussia, B., V. Fanning, et al. (1983). "A human NK and K cell subset shares with cytotoxic T cells expression of the antigen recognized by antibody OKT8." J Immunol **131**(1): 223-31.
- Perussia, B., V. Fanning, et al. (1985). "A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses." Nat Immun Cell Growth Regul **4**(3): 120-37.
- Perussia, B., G. Trinchieri, et al. (1984). "The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies." J Immunol **133**(1): 180-9.
- Pestka, S. (2000). "The human interferon alpha species and receptors." Biopolymers **55**(4): 254-87.
- Piccioli, D., S. Sbrana, et al. (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." J Exp Med **195**(3): 335-41.
- Poeck, H., R. Besch, et al. (2008). "5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma." Nat Med **14**(11): 1256-63.
- Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science **282**(5396): 2085-8.
- Poltorak, A., I. Smirnova, et al. (1998). "Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region." Blood Cells Mol Dis **24**(3): 340-55.
- Presky, D. H., H. Yang, et al. (1996). "A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14002-7.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, et al. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." J Exp Med **189**(4): 615-25.
- Randolph, G. J., S. Beaulieu, et al. (1998). "Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking." Science **282**(5388): 480-3.
- Raulet, D. H. (2004). "Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response." Nat Immunol **5**(10): 996-1002.
- Renner, C., F. Hartmann, et al. (2000). "Initiation of humoral and cellular immune responses in patients with refractory Hodgkin's disease by treatment with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody." Cancer Immunol Immunother **49**(3): 173-80.

- Rock, F. L., G. Hardiman, et al. (1998). "A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 588-93.
- Rodewald, H. R., P. Moingeon, et al. (1992). "A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells." *Cell* **69**(1): 139-50.
- Romagnani, C., M. Della Chiesa, et al. (2005). "Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells." *Eur J Immunol* **35**(8): 2452-8.
- Romani, N., S. Gruner, et al. (1994). "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." *J Exp Med* **180**(1): 83-93.
- Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, et al. (1993). "Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer." *J Natl Cancer Inst* **85**(8): 622-32.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med* **179**(4): 1109-18.
- Sanchez-Torres, C., G. S. Garcia-Romo, et al. (2001). "CD16+ and CD16- human blood monocyte subsets differentiate in vitro to dendritic cells with different abilities to stimulate CD4+ T cells." *Int Immunol* **13**(12): 1571-81.
- Santini, S. M., C. Lapenta, et al. (2000). "Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice." *J Exp Med* **191**(10): 1777-88.
- Scheel, B., S. Aulwurm, et al. (2006). "Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA." *Eur J Immunol* **36**(10): 2807-16.
- Scheel, B., R. Teufel, et al. (2005). "Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA." *Eur J Immunol* **35**(5): 1557-66.
- Schlee, M., V. Hornung, et al. (2006). "siRNA and isRNA: two edges of one sword." *Mol Ther* **14**(4): 463-70.
- Schmidt, K. N., B. Leung, et al. (2004). "APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA." *J Immunol* **172**(1): 138-43.
- Semino, C., L. Martini, et al. (1999). "Adoptive immunotherapy of advanced solid tumors: an eight year clinical experience." *Anticancer Res* **19**(6C): 5645-9.
- Shepard, J. L. and L. I. Zon (2000). "Developmental derivation of embryonic and adult macrophages." *Curr Opin Hematol* **7**(1): 3-8.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." *Nat Rev Immunol* **2**(3): 151-61.
- Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* **284**(5421): 1835-7.
- Sioud, M. (2005). "Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization." *J Mol Biol* **348**(5): 1079-90.
- Sivori, S., S. Carlomagno, et al. (2006). "Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells." *Eur J Immunol* **36**(4): 961-7.
- Sivori, S., M. Falco, et al. (2004). "CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10116-21.
- Soutschek, J., A. Akinc, et al. (2004). "Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs." *Nature* **432**(7014): 173-8.

- Sugiyama, T., M. Gursel, et al. (2005). "CpG RNA: identification of novel single-stranded RNA that stimulates human CD14<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> monocytes." J Immunol **174**(4): 2273-9.
- Taguchi, T., J. L. Mitcham, et al. (1996). "Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14." Genomics **32**(3): 486-8.
- Takahashi, K., M. J. Donovan, et al. (1998). "Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood." Cell Tissue Res **292**(2): 311-23.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (2000). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection." J Immunol **165**(10): 5392-6.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-51.
- Takeuchi, O., A. Kaufmann, et al. (2000). "Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway." J Immunol **164**(2): 554-7.
- Takeuchi, O., T. Kawai, et al. (1999). "TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family." Gene **231**(1-2): 59-65.
- Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, et al. (2005). "Macrophage receptors and immune recognition." Annu Rev Immunol **23**: 901-44.
- Termeer, C., F. Benedix, et al. (2002). "Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4." J Exp Med **195**(1): 99-111.
- Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, et al. (1996). "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells." Nature **382**(6587): 171-4.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.
- Trinchieri, G. (1993). "Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells." Immunol Today **14**(7): 335-8.
- Trinchieri, G. (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity." Annu Rev Immunol **13**: 251-76.
- Trinchieri, G. (1995). "Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis." Semin Immunol **7**(2): 83-8.
- Trinchieri, G. (1998). "Immunobiology of interleukin-12." Immunol Res **17**(1-2): 269-78.
- Trinchieri, G. (1998). "Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity." Adv Immunol **70**: 83-243.
- Trinchieri, G. (1998). "Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12." Int Rev Immunol **16**(3-4): 365-96.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-46.
- Trinchieri, G., D. Santoli, et al. (1978). "Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation." J Exp Med **147**(5): 1299-1313.
- Trinchieri, G., D. Santoli, et al. (1978). "Spontaneous cell-mediated cytotoxicity in humans: role of interferon and immunoglobulins." J Immunol **120**(6): 1849-55.
- Uematsu, S., M. H. Jang, et al. (2006). "Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina propria cells." Nat Immunol **7**(8): 868-74.

- Underhill, D. M. (2003). "Toll-like receptors: networking for success." Eur J Immunol **33**(7): 1767-75.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, et al. (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14459-63.
- van Furth, R. and Z. A. Cohn (1968). "The origin and kinetics of mononuclear phagocytes." J Exp Med **128**(3): 415-35.
- Van Furth, R., M. C. Diesselhoff-den Dulk, et al. (1973). "Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction." J Exp Med **138**(6): 1314-30.
- Vilches, C. and P. Parham (2002). "KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity." Annu Rev Immunol **20**: 217-51.
- Visintin, A., A. Mazzoni, et al. (2001). "Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells." J Immunol **166**(1): 249-55.
- Wagner, M., H. Poeck, et al. (2004). "IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA." J Immunol **172**(2): 954-63.
- Weber, C., K. U. Belge, et al. (2000). "Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations." J Leukoc Biol **67**(5): 699-704.
- Williams, M. J., A. Rodriguez, et al. (1997). "The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense." Embo J **16**(20): 6120-30.
- Wilson, H. L., A. Dar, et al. (2006). "Immune mechanisms and therapeutic potential of CpG oligodeoxynucleotides." Int Rev Immunol **25**(3-4): 183-213.
- Wingard, S. A. (1928). "Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants." J. Agric. Res. **37**: 127 – 153. .
- Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." Science **308**(5728): 1626-9.
- Yokoyama, W. M. (1993). "Recognition structures on natural killer cells." Curr Opin Immunol **5**(1): 67-73.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-7.
- Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." Science **303**(5663): 1522-6.
- Zhang, X., S. Sun, et al. (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." Immunity **8**(5): 591-9.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., G. Fingerle, et al. (1993). "The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages." Eur J Immunol **23**(9): 2053-8.

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

3M-001	Synthetischer Ligand für TLR7
3M-002	Synthetischer Ligand für TLR8
3M-003	Synthetischer Ligand für TLR7 und TLR8
ADCC	Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität
AP-1	<i>activating protein 1</i>
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AR	<i>Killer activating receptor</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigen</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CARD	<i>Caspase recruit domain</i>
CCR	Chemokinrezeptoren
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CLIR	<i>C-type-lectin inhibitory receptor</i>
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
cpm	<i>Counts per minute</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTAP	(N-[1-(2-3-Dioleoyloxy)-Propyl]-N,N,N-Trimethylammonium)methylsulfat
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
EBI3	<i>Epstein-Barr-Virus-induced gene 3</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fötales Kälberserum

FITC	Fluorescein-Isocyanat
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HSA	Humanes Serum-Albumin
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>IkappaB kinase complex</i>
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IMDM	<i>Iscoe's modified Dulbecco's medium</i>
IPC	Interferon-produzierende Zelle
IRAK 1/ 4	IL-1R-assoziierte Kinase 1/ 4
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
isRNA	<i>immunstimulatory RNA</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KIR	<i>Killer inhibitory receptor</i>
LAM	Lipoarabinomannan
LBP	lipid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeats</i>
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAF	Makrophagen-aktivierender Faktor
MALP-2	<i>Macrophage-activating lipopeptide 2</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
Mda5	Melanoma differentiation-associated gene-5
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NALP	<i>NACHT domain, LRR domain, PYD containing protein</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NKR-P1	<i>Natural killer receptor-p1</i>

---

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	<i>Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like</i> Rezeptor
NO	Stickoxid
NOD	<i>Nucleotide oligomerization domain</i>
ODN	Oligodesoxynukleotid
OPNi	<i>Osteopontin precursur</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PKR	Proteinkinase R
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
PTZ	Plasmazytoide T-Zelle
PYD	<i>PYRIN domaine</i>
R848	Synthetischer Ligand für TLR7 und TLR8
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene-I</i>
RLH	<i>Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like helicase</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of mean</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
ssRNA	<i>Single-stranded RNA</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
T <sub>H</sub>	T-Helfer
TIR	Toll/ IL-1R-Domäne
TIRAP	<i>TIR domain containing adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>

TNF	<i>Tumor nekrosis factor</i>
TNF-R	TNF-Rezeptor
TRAF6	TNF-R-assoziiierter Faktor 6
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-<math>\beta</math></i>
TZR	T-Zellrezeptor



## Danksagung

Herrn Prof. Stefan Endres und Herrn Prof. Gunther Hartmann danke ich für die Aufnahme in die sehr erfahrene, höchst fachkundige und motivierte Forschungsgruppe sowie für die Überlassung dieses spannenden Themas.

Für die kontinuierliche Betreuung der wissenschaftlichen Arbeit bedanke ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Veit Hornung. Mein ganz besonderer Dank gilt ihm in seiner Funktion als Betreuer für die herausragende wissenschaftliche Anleitung auf täglicher Basis.

Mein Dank gilt des Weiteren den Mitdoktoranden Frau Andrea Ablasser, Frau Sarah Kim sowie Frau Susanne Roth für eine Arbeitsgemeinschaft in einem tatkräftigen Team.

Bei Frau Julia Vorac bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Durchführung wichtiger Experimente. Frau Andrea Mühlberger danke ich für die große Hilfestellung bei organisatorischen Aufgaben.

## Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen vorgestellt und als **Abstract** veröffentlicht:

1. **M Berger.**  
Funktionelle Aspekte immunstimulatorischer RNA.  
*Statusseminar des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ 2005*  
Herrsching, Deutschland
2. **M Berger**, V Hornung, A Ablasser, S Kim, S Endres, G Hartmann.  
TLR8-driven interplay of NK cells and monocytes.  
*Crossroads between innate and adaptive immunity 2005*  
Rhodes, Greece
3. A Ablasser, V Hornung, **M Berger**, S Kim, I Bekeredjian-Ding, S Endres, G Hartmann.  
Single-stranded RNA as a potent TLR8 ligand in humans.  
*Crossroads between innate and adaptive immunity 2005*  
Rhodes, Greece
4. S Kim, V Hornung, A Ablasser, **M Berger**, M Guenthner-Biller, I Bekeredjian-Ding, S Endres, G Hartmann.  
CpG-Classes – a mystery unravelled: Autocrine and paracrine type I interferons dramatically boost the responsiveness of plasmacytoid dendritic cells to TLR-stimulation.  
*Crossroads between innate and adaptive immunity 2005*  
Rhodes, Greece
5. V Hornung, S Kim, A Ablasser, **M Berger**, M Guenthner-Biller, I Bekeredjian-Ding, S Endres, G Hartmann.  
CpG-Classes – a mystery unravelled: Autocrine and paracrine type I interferons dramatically boost the responsiveness of plasmacytoid dendritic cells to TLR-stimulation.  
*First meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society 2005*  
New York, USA
6. A Ablasser, V Hornung, **M Berger**, S Kim, I Bekeredjian-Ding, S Endres, G Hartmann.  
Single-stranded RNA as a potent TLR8 ligand in humans.  
*First meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society 2005*  
New York, USA

7. M Schlee, V Hornung, S Kim, A Ablasser, **M Berger**, M Guenther-Biller, I Bekeredjian-Ding, S Endres, G Hartmann.  
CpG-Classes – a mystery unravelled: Autocrine and paracrine type I interferons dramatically boost the responsiveness of plasmacytoid dendritic cells to TLR-stimulation.  
*Toll 2006*  
Salvador, Brasilien
8. **M Berger.**  
Zusammenspiel der NK-Zellen und Monozyten nach Stimulation mit immunstimulatorischer RNA.  
*Statusseminar des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ 2006*  
Herrsching, Deutschland

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in folgenden internationalen Fachzeitschriften als **Originalarbeiten** veröffentlicht oder sind eingereicht:

1. **M Berger**, A Ablasser, S Kim, I Ding, T Giese, S Endres, V Hornung, G Hartmann.  
TLR8-driven IL-12 dependent reciprocal and synergistic activation of NK cells and monocytes by immunostimulatory RNA.  
*J Immunother. 2009 Apr;32(3):262-71.*
2. A Ablasser, H Poeck, D Anz, **M Berger**, M Schlee, S Kim, C Bourquin, N Goutagny, Z Jiang, KA Fitzgerald, S Rothenfusser, S Endres, G Hartmann, V Hornung.  
Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes.  
*J Immunol. 2009 Jun 1;182(11):6824-33.*
3. C Bourquin, L Schmidt, A Lanz, B Storch, C Wurzenberger, D Anz, **M Berger**, H Poeck, G Hartmann, V Hornung, S Endres.  
Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK-cell response through Toll-like receptor 7  
*2009, under 2. review, Journal of Immunology.*

## Lebenslauf

### Michael Berger

Geboren am 20. August 1980 in Essen

Sohn von Dr. Ing. Dipl.-Phys. Udo Berger und seiner Ehefrau Gabriele Berger

Deutsche Staatsangehörigkeit

### Schulische Ausbildung

1986 – 1987	<i>Elementary School Nottingham Forest</i> , Houston, Texas, USA
1987 – 1991	Grundschule Saarnberg, Mülheim an der Ruhr
1991 – 1997	Gymnasium Broich, Mülheim an der Ruhr
1997 – 1998	<i>Friendswood High School</i> , Friendswood, Texas, USA
1998 – 2000	Gymnasium Broich, Mülheim an der Ruhr
2000	Abitur am Gymnasium Broich, Mülheim an der Ruhr

### Zivildienst

2000 – 2001	Pflegedienst, Stationsdienst, Chirurgische Klinik Innenstadt Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
-------------	--

### Studium

2001	Beginn des <b>Studiums der Humanmedizin</b> Ludwig-Maximilians-Universität München
2002	<b>Studium der Humanmedizin</b> , <i>Universidad de Miguel Hernández de Elche</i> , San Juan, Spanien
2004 – 2006	<b>Promotionsstudium Molekulare Medizin</b>
2006 – 2007	Praktisches Jahr (Spanien und USA)
2008	<b>2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Ärztliche Approbation</b> , Ludwig-Maximilians-Universität München
2008	<b>ECFMG-Certificate</b> (USMLE, Ärztliche Approbation USA)
2009	USMLE Step 3

### Famulaturen

2003	<b>Chirurgische Ambulanz</b> , Chirurgische Klinik Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
2004	<b>Orthopaedic Surgery</b> , <i>Fondren Orthopaedic Group</i> , Houston, Texas, USA
2004	<b>Surgical Intensive Care</b> , <i>Baylor College of Medicine</i> , Houston, Texas, USA)
2004	<b>Neurosurgery</b> , <i>Baylor College of Medicine</i> , Houston, Texas, USA

**Praktisches Jahr**

1. Pädiatrie *Hospital Universitario de San Juan de Alicante, Universidad de Miguel Hernández de Elche, Spanien*
- 2a. Chirurgie *Hermann Hospital Houston, University of Texas, Houston, Texas, USA*
- 2b. Chirurgie *Texas Children's Hospital, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA*
3. Innere Medizin *Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Harvard University, Boston, Massachusetts, USA*

**Promotion**

2004– 2008      Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Medizinische Klinik – Innenstadt  
Klinikum der Universität München  
Ziemssenstr. 1  
80336 München

Leiter: Prof. Dr. S. Endres

**Ärztliche Ausbildung**

Seit 2008      Kinderchirurgischer Assistenzarzt  
Kinderchirurgische Klinik und Poliklinik  
Dr. von Haunersches Kinderspital  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lindwurmstr. 4  
80337 München

Direktor: Prof. Dr. D. von Schweinitz

**Stipendien**

2002      **Studium der Anatomie** an der *Universidad de Miguel Hernández de Elche*, Spanien, Schirmherr Prof. Dr. R. Putz, Ludwig-Maximilians-Universität München

2004      Stipendiat des **Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“**, Ludwig-Maximilians-Universität München

2006      Stipendiat der **München-Harvard-Allianz**, Ludwig-Maximilians-Universität München